ASPECTE ACTUALE DE BIOLOGIE ȘI FIZIOLOGIE MOLECULARĂ

Coordonatori:

Z. SIMON și F. SCHNEIDER

EDITURA „VIAȚA MEDICALĂ ROMÂNEASCĂ“
1998

Scanned with OKEN Scanner

ASPECTE ACTUALE DE BIOLOGIE ȘI FIZIOLOGIE MOLECULARĂ

Coordonatori:
Prof. dr. Z. SIMON și prof. dr. F. SCHNEIDER

Domnului Profesor Valeriu Rezuș
cu deosebită considerație și
alese sentimente de prețuire

CONTRIBUTORI:

Chim. Florin L. Eleneș, Centrul de chimie al Academiei, Timișoara.

Conf. dr. Ludovic Kurunczi, Facultatea de farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie, Timișoara.

Prof. dr. Gheorghe I. Mihalaș, Catedra de Informatică medicală și biofizică, Universitatea de Medicină și Farmacie, Timișoara.

Dr. Tudor Ionel Oprea, Research Scientist, Astra Hassle AB, Molndal, Suedia, fost preparator la Disciplina de fiziologie, Universitatea de Medicină și Farmacie, Timișoara.

Șef lucrări dr. Sorin Popa, Catedra de chimie biologică, Universitatea de Ştiinţe Agricole a Banatului, Timișoara.

Dr. med. Ovidiu Sârbu, Institutul de sănătate publică, Timișoara.

Prof. dr. Francisc Schneider, Disciplina de fiziologie, Universitatea de Medicină și Farmacie, Timișoara, și Universitatea de Vest „Vasile Goldiș", Arad.

Chim. Edward P. Șeclăman, Centrul de chimie al Academiei, Timișoara.

Prof. dr. Zeno Simon, Catedra de Chimie, Universitatea de Vest, Timișoara, fost profesor de biofizică, Universitatea de Medicină și Farmacie, Timișoara.

Dr. med. Călin Țațu, fost preparator la Disciplina de fiziologie, Universitatea de Medicină și Farmacie, Timișoara, University of Nord Carolina at Chapel Hill, N. C., USA.

Scanned with OKEN Scanner

ASPECTE ACTUALE DE BIOLOGIE ȘI FIZIOLOGIE MOLECULARĂ

Coordonatori:

Prof. dr. Z. SIMON și prof. dr. F. SCHNEIDER

Editura VIAȚA MEDICALĂ ROMÂNEASCĂ

1998

Scanned with OKEN Scanner

ISBN 973-9320-07-4

Redactori de carte: dr. Laurenţiu REMBAS-ILIESCU
Alice ŢUCULESCU

Tehnoredactor: Ioan DUMITRENCO

Tehnoredactare computerizată
şi coperta: Gina MANCIU

Operatori computer: Marcela ICHIM
Berta ALEXE

Corectori: Eugenia PETRESCU
Viorica ÎNDOILĂ
Emil FRĂŢILĂ

Tiparul executat la
S.C. ROMCARTEXIM S.A.
Tel.: 211.30.16; Fax: 211.27.52
Bucureşti

Scanned with OKEN Scanner

CUVÂNT ÎNAINTE

Prezenta carte reprezintă o trecere în revistă ale unor deosebit de actuale domenii ale biologiei și fiziologiei moleculare, indispensabile atât pentru cei ce năzuiesc să pătrundă în tainele biologiei și medicinii, cât și cercetătorilor din domeniu.

Cartea pornește de la chimia, fizica și matematica biologicului, tratează problemele funcționale de bază ale treptei sistemice celulare și se încheie cu aspecte ale imunologiei umorale și celulare, precum și ale participării sistemului imun în reglajul supracelular al ansamblului organismic.

Colectivul de autori este reprezentat de cercetători licențiați în chimie, fizică, matematică, informatică și medicină, preocupați de aspectele fundamentale ale viului.

Probitatea științifică este garantată de coordonatorii reprezentați de profesorul Zeno Simon – eminent specialist în biologie teoretică, binecunoscut în lumea științifică mondială, și de profesorul Francisc Schneider unul dintre cei mai reprezentativi fiziologi români, cu recunoaștere europeană.

Prof. dr. Aurel Ardelean
Rector al Universității de Vest „Vasile Goldiș", Arad

Scanned with OKEN Scanner

ÎN LOC DE INTRODUCERE

F. SCHNEIDER ŞI Z. SIMON

Orizontul cercetării s-a extins enorm, până la ceea ce numim azi ştiinţe biomedicale, care cuprind domenii multiple ale căror frontiere sunt foarte dificil de definit. Un lucru este cert, profunzimea abordării analitice la nivel molecular este indispensabilă pentru înţelegerea esenţei fenomenelor vieţii. Cu metodele şi tehnicile biologiei moleculare contemporane încep să fie considerate frontierele, dar şi punţile de legătură dintre sisteme şi subsisteme vii, între aspectele evolutive normale şi deviate.

Primele încercări de a lega fenomenele de la scară moleculară cu cele ale materiei vii datează cam de pe la începutul secolului. Termenul de biologie moleculară a apărut pe la începutul anilor '50, o dată cu descifrarea structurii spaţiale de către L. Pauling şi cu descifrarea structurii acidului dezoxiribonucleic, împreună cu semnificaţia acesteia pentru codul genetic, de către F. Crick şi J. D. Watson. De atunci, de aproape 50 de ani, domeniul continuă să fie în vârf şi baza unei dezvoltări susţinute a ştiinţelor biologice şi medicale.

În titlul ales, vorbim despre fiziologie şi biologie moleculară, întrucât fiziologia modernă, ca bază a medicinii, este din ce în ce mai legată de aspectele moleculare ale fenomenelor din organismul viu. Având în vedere dezvoltarea extrem de rapidă a domeniului credem că este imperios necesar o lucrare care să dea o vedere de ansamblu asupra problematicii, pentru ca cei interesaţi în diferite aspecte să ştie ce şi unde – în literatura de specialitate, să caute. Nu am putut

Scanned with OKEN Scanner

acoperi integral obiectivele fiziologiei și biologiei moleculare. Ne referim numai la unele elemente, și anume la acelea pentru care am găsit, în Centrul universitar Timișoara, persoane care să cunoască suficient de bine elementele la care se referă cele peste o duzină de capitole ale acestei lucrări, pentru a le scrie.

Fiziologia și biologia moleculară sunt în perioada actuală discipline fundamentale de sinteză atât a biologiei, cât și a medicinii. Aceasta în condițiile actuale când suntem în desfășurarea celei mai fertile perioade și concretizare a unor cercetări analitice din ce în ce mai profunde ale materiei vii la nivel molecular.

Culegerea de față oferă atât esența înțelegerii analitice ale fenomenologiei viului, cât și posibilitatea conectării acestuia la nivel sistemic supracelular.

Scopul cărții este de a da o imagine generală a diferitelor capitole, teoretice și experimentale, de fiziologie și biologie moleculară. Capitolele conțin și indicații bibliografice, de preferință lucrări relativ ușor accesibile în bibliotecile centrelor universitare românești, pentru cei interesați de a aprofunda studiile respective, tehnicile experimentale și teoretice – descrise doar sumar aici.

Ea se adresează studenților de medicină din ultimii ani, dar și studenților de chimie, biologie, agronomie și de la alte facultăți, interesați de aceste domenii. Pentru studenții de medicină, lucrarea poate constitui un auxiliar pentru partea de „preclinic" a examenului de diferență, necesar recunoașterii diplomei românești în țări precum SUA sau Canada. Cartea se adresează și cercetătorilor din domeniul medicinii, chimiei și biologiei, care urmează să abordeze tematica de cercetare prin metodele fiziologiei și biologiei moleculare.

Aducem mulțumiri Fundației „Vasile Goldiș" și Universității de Vest „Vasile Goldiș" din Arad, pentru asigurarea publicării acestei cărți.

Scanned with OKEN Scanner

DE LA CHIMIE FIZICĂ LA CELULA VIE

Z. SIMON, F. L. ELENEŞ ŞI E. P. ŞECLĂMAN

Introducere. Definiţia vieţii

Materia vie, viaţa, cel puţin pentru formele primitive, poate fi definită prin următoarele proprietăţi:

– *metabolism,* transformarea substanţelor din exterior în molecule ale organismului viu;

– *creştere,* înglobarea de molecule specifice, cu creşterea greutăţii şi volumului;

– *diviziunea* organismului părinte în organisme descendente, când greutatea (volumul) depăşeşte un prag;

– *ereditate/variabilitate,* transmiterea aproape exactă a caracterelor părintelui către descendenţi; stă la baza capacităţii de adaptare la mediu.

Organismele primitive pot fi considerate ca automate autoreproducătoare. Cel mai simplu exemplu este *celula procariotă,* bacteriile. Cea mai mică bacterie cunoscută, *Mycoplasma laidlwii* H39, are un volum $V \cong 2x10^{-14}$ cm^3, diametrul $\Phi \cong$ 3000 Å, iar informaţia genetică este înscrisă pe un DNA cu aproximativ 10^6 bp (perechi baze). Această bacterie trăieşte în medii bogate în substanţe organice relativ complexe, rezultate din putrefacţie. O bacterie mai comună, *Escherichia coli,* are $V \cong 2x10^{-12}$ cm^3, este un bastonaş lung de circa $3x10^4$ Å, cu diametrul de 10^4 Å, are o informaţie genetică în DNA de $6x10^6$ bp şi poate trăi şi în medii sărace (de exemplu, acetat ca sursă de carbon, ionii amoniu ca sursă de azot, ioni minerali).

Virusurile sunt gene sau grupe de gene autonomizate, care se replică independent într-o celulă vie, folosindu-se de metabolismul şi aparatul enzimatic al acesteia. Nu au metabolism propriu. *Prionii,* agenţii cauzali ai unor boli neurodegenerative, sunt proteine din SNC (sistemul nervos central), a căror conformaţie fiziologică activă nu este şi cea mai stabilă din punct de vedere termodinamic; în plus, conformaţia stabilă are proprietăţi autocatalitice pentru transformarea conformaţiei active în cea stabilă. Viruşii şi prionii nu se încadrează în definiţia de mai sus pentru materia vie.

Scanned with OKEN Scanner

Celulele eucariote sunt automate autoreproducătoare, părți componente ale organismului pluricelular. Ca atare, sunt mai mari și complexe ($V \cong 10^{-9}$ cm^3, $\phi \cong 10^5$ Å) decât procariotele și ascultă de mecanismele de reglaj care limitează chiar propria capacitate de diviziune.

Caracteristicile specifice ale materiei vii (sisteme vii)

Creșterea în complexitate pe scara diferitelor sisteme aduce proprietăți caracteristice calitativ noi, care nu au sens la sisteme mai simple.

Reacțiile chimice și procesele de difuzie și transport sunt controlate de legile termodinamicii și ale cineticii chimice. În celulă, majoritatea reacțiilor au loc la aproximativ 300 K (37°C) și pH ≅ 7, fiind extrem de lente; prin enzime-catalizatori specifici au loc cu viteză observabilă numai reacțiile utile funcționării celulei. Procesele sunt astfel subordonate funcțiilor specifice ale organismului viu (celulei). Reamintim aici că toate procesele biologice (considerând, pe lângă organismul care crește, consumul de nutrienți și eliminarea produșilor de excreție), care au loc la temperatură (T) și presiune (P) constante, decurg cu scăderea entalpiei libere Gibbs:

$$G = U + PV - TS;\ \Delta G = \Delta U + P\Delta V - T\Delta S \leq 0$$

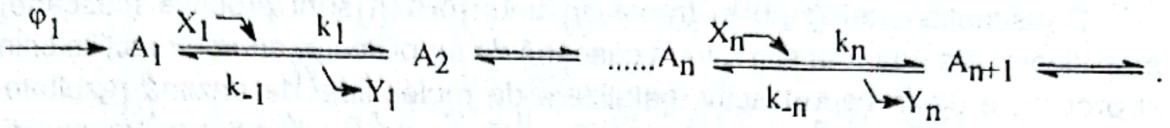
Relația $\Delta G \leq 0$ corespunde unui compromis între tendința sistemului de a ajunge la o energie internă U cât mai scăzută și tendința spre starea cea mai probabilă, cu o dezordine cât mai mare, cu o entropie S cât mai mare. Termenul presiune externă P înmulțit cu volumul V al sistemului este de regulă neglijabil la presiunea uzuală (P = 1 atm), cel puțin pentru sisteme condensate.

Procese controlate termodinamic și procese controlate cinetic

Sunt posibile numai procesele care tind spre starea de echilibru termodinamic, adică scăderea entalpiei libere Gibbs, $\Delta G < 0$. La echilibru există un minimum local al G-sistem. Fenomenele din sistemele vii au loc în anumite intervale de timp, „t_{biol}". Dacă durata ajungerii la echilibru al unui proces, *timpul de relaxare* Θ, este foarte lungă, $\Theta >> t_{biol}$, practic procesul nu are loc, ci au loc alte procese mai rapide, care duc la un minimum (local) diferit, cu G-sistem mai puțin scăzut. Procesele suficient de rapide sunt *controlate termodinamic*, cele relativ lente sunt *controlate cinetic*.

Scanned with OKEN Scanner

Fie un lanţ de procese:



Dacă vitezele de reacţie sunt mari, timpii de relaxare pentru diferitele etape $\Theta_i \cong 1/k_i[X_i] << t_{biol}$, concentraţiile speciilor sunt în raport de echilibru, $[A_{n+1}]:[A_n]: \ldots: [A_2]:[A_1] = K_n: \ldots : K_1$, $(K_i = k_i[X_i]/k_{-i}[Y_i])$; întregul lanţ este controlat termodinamic.

Dacă anumite viteze de reacţie sunt mici, de exemplu pentru $A_1 \rightarrow A_2$, $\Theta_1 >> t_{biol}$, va conta viteza de formare a lui A_2, $v_2 = d[A_2]/dt = k_1[x_1][A_1]$, lanţul va fi, cel puţin în parte, controlat cinetic.

Sistemele vii, chiar celulele procariote, sunt extrem de complexe. Lanţuri de tipul celui de mai sus se pot ramifica. Produşii unui proces (de exemplu, A_{n+1}) pot accelera (feed-back pozitiv) sau inhiba (feed-back negativ) un proces anterior (de exemplu $A_1 \rightarrow A_2$) de pe acelaşi lanţ sau de pe un lanţ diferit (nu se poate vorbi de feed-back în ultimul caz). Pot interveni procese (cascade) de *amplificare;* de exemplu, transcripţia unei gene cu formarea unui număr mare de molecule de mRNA, în cursul ciclului celular, reprezintă un proces de amplificare. Reacţiile chimice sunt în foarte multe cazuri catalizate de enzime. Enzimele prezintă un grad ridicat de *specificitate;* o anumită enzimă catalizează un anumit tip de reacţii ale unui anumit tip de moleculă (sau ale unei clase de molecule cu o anumită constelaţie de atomi), nu şi a altor molecule (clase de molecule), existente în celulă. *Specificitatea* se extinde şi la alte procese, de exemplu o enzimă poate fi reglată (activată sau inhibată) de o anumită moleculă, nu şi de alte molecule care există în celulă.

Toate aceste interacţii între procese şi lanţuri de procese duc la fenomenele caracteristice ale reglajului celular. Unele fenomene pot fi reproduse şi în sisteme fizico-chimice, mult mai simple. Este vorba de *starea staţionară* – sistem deschis, în care au loc schimburi nete (macroscopice) de substanţe cu exteriorul şi se consumă energie, dar concentraţiile componentelor sistemului rămân constante în timp, sau – *reacţii oscilante,* când concentraţiile unor componente din sistem oscilează, adică suferă schimbări periodice în timp. Procesele de difuzie pot duce şi la modificări periodice în spaţiu ale acestor concentraţii. Celula prezintă însă un sistem heterogen şi multicompartimentat, ceea ce creează posibilităţi suplimentare de apariţie a unor fenomene calitativ noi în raport cu sisteme mai simple, modele *in vitro.*

O caracteristică importantă a reglajului în celula vie este aşa-numita dogmă centrală a biologiei moleculare (vezi figura 1):

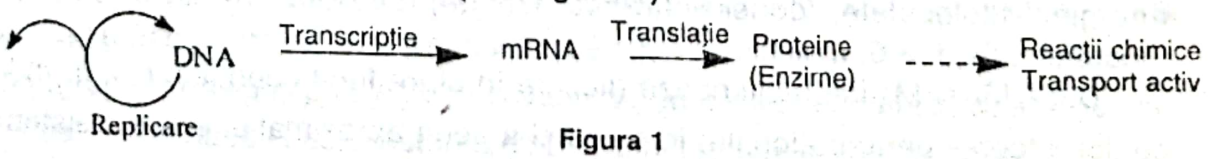


Figura 1

Scanned with OKEN Scanner

Transcripţia unei gene şi translaţia unui mRNA sunt procese (cascade) de amplificare; am adăugat şi o a treia cascadă de amplificare, anume reacţiile chimice şi procesele de transport activ, catalizate de moleculele de enzimă rezultate din primele două cascade. Evident, intervin o serie de feed-back-uri; transcripţia şi translaţia implică baterii de enzime, reglaj prin proteine şi micromolecule, iar toate aceste molecule suferă şi procese de degradare, de asemenea catalizate enzimatic.

Este clar că o înţelegere a proceselor de reglaj celular, ceea ce, cel puţin la nivel cantitativ, înseamnă şi traducerea lor într-un model matematic, este o problemă extrem de dificilă. Un ajutor în înţelegerea globală a acestor procese îl constituie *principiul evolutiv:* procesele şi sistemele de reglaj dintr-un ansamblu biologic (de exemplu, celule eucariote de mamifer) rezultă prin creşterea gradului de complexitate a proceselor existente în sisteme mai simple pe scara evolutivă (de exemplu, celule eucariote din organisme pluricelulare mai primitive, iar acestea din celule procariote – bacterii). Creşterea gradului de complexitate duce la adaptarea sistemului biologic pentru efectuarea unor procese importante în vederea supravieţuirii şi reproducerii - procesele şi sistemele de reglaj trebuie să prezinte o fiabilitate cât mai bună şi să fie cât mai economicoase din punct de vedere al numărului de proteine implicate şi al randamentului energetic.

Forţe intermoleculare. Mecanica moleculară

Interacţia receptor-efector este dominată de forţe intermoleculare. Dacă subsumăm şi reacţiile enzimatice (enzimă-substrat) ale acestei interacţii, aici intervin şi probleme de reactivitate, de rupere şi refacere a unei legături chimice.

Din punctul de vedere al chimiei cuantice, forţele intermoleculare ce apar între două molecule, M_A şi M_B, pot fi explicate prin calculul perturbaţional. Pentru cele două molecule, ecuaţiile Schrödinger corespunzătoare se pot scrie ca:

$$\bar{H}_A \Psi_n^A = E_n^A \Psi_n^A \quad (1a); \qquad \bar{H}_A \Psi_m^B = E_m^B \Psi_m^B \quad (1b)$$

$\bar{H}_A$, $\bar{H}_B$ sunt operatorii pentru energia cinetică şi interacţiile electrostatice (electron-nucleu, electron-electron, nucleu-nucleu) din M_A şi, respectiv, M_B, Ψ_n^A şi Ψ_m^B – funcţiile de undă ce descriu stările celor două molecule, E_n^A, E_m^B – valorile proprii ale energiei. Moleculele, considerate ca izolate, se află în stare electronică fundamentală, n = 0, m = 0.

Dacă M_A şi M_B interacţionează (fiecare în stare fundamentală, n = 0, m = 0), conform teoriei perturbaţionale, în prima şi a doua aproximaţie, energia sistemului M_A+M_B devine:

Scanned with OKEN Scanner

$$E = E_0^A + E_0^B + E_{(1)}^{AB} + E_{(2)}^{AB};\quad E_{(1)}^{AB} = \int \Psi_0^A \overline{W} \Psi_0^B dv = W_{00}$$

$$E_{(2)}^{AB} = \sum_{n>0} \frac{W_{n0}^2}{E_0^A - E_n^A} + \sum_{m>0} \frac{W_{m0}^2}{E_0^B - E_m^B};\quad W_{nm} = \int \Psi_n^A \overline{W} \Psi_m^B dv \qquad (2)$$

Aici, $\overline{W}$ este operatorul ce descrie interacţiile electrostatice între electroni, nuclee – aflate pe molecule diferite. Sumele din expresia energiei perturbaţionale în a doua aproximaţie, $E_{(2)}^{AB}$, se fac peste stările excitate ale moleculei M_A şi, respectiv, M_B.

Privita mai intuitiv, clasic, interacţia între un receptor (R) şi un ligand (efector) L_i, care are loc de regulă în mediu apos, poate fi descompusă într-un proces de deshidratare parţială şi în interacţia partenerilor deshidrataţi.

$$\begin{array}{ccc} R(aq) + L_i(aq) & \xrightarrow{\Delta G_i} & C_i^*(aq) \\ \Big\downarrow \Delta G_i^{(1)} \; -nH_2O & & +mH_2O \; \Delta G_i^{(3)} \Big\downarrow \\ R + L_i & \xrightarrow{\Delta G_i^{(2)}} & C_i^* \end{array}$$

Ţinând seama de deshidratarea parţială, afinitatea receptor-ligand ΔG_i poate fi scrisă ca:

$$\Delta G_i = \Delta G_{RL_i}^{desh} + \Delta U_{RL_i} - T\Delta S_{RL_i} \qquad (4)$$

$$\text{unde: } \Delta G_i^{(1)} + \Delta G_i^{(3)} = \Delta G_{RL_i}^{desh};\ \Delta G_i^{(2)} = \Delta U_{RL_i} - T\Delta S_{RL_i} \qquad (5)$$

S-a neglijat aici diferenţa ($P\Delta V$ – mică în medii condensate) între entalpia liberă Gibbs G şi energia liberă F.

Termenii ecuaţiei (4) sunt determinaţi de forţele intermoleculare care apar între parteneri, de contribuţiile de entropie legate de deshidratarea parţială şi de combinarea partenerilor deshidrataţi şi de energia cheltuită pentru o deformare a moleculelor R şi L_i, care să permită o afinitate maximă. Este utilă o descriere a tipurilor de forţe intermoleculare şi a celorlalte tipuri de efecte care intervin.

Forţele van der Waals intervin în toate interacţiile dintre molecule. Ca şi celelalte tipuri de forţe, ele pot fi considerate aditive, ca sume între interacţiile dintre atomi (grupări) nelegaţi prin legături covalente. Se foloseşte, de regulă, aşa-numitul potenţial 6–12; dacă R este distanţa dintre atomii (grupele) în interacţie:

Scanned with OKEN Scanner

$$U_{vdW} = -\frac{A}{R^6} + \frac{B}{R^{12}}; \qquad A = a_1 a_2 \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \tag{6}$$

a_1, a_2 sunt polarizabilităţile celor doi atomi, I_1 şi I_2 potenţialele lor de ionizare, formula pentru A se referă la interacţia dintre doi atomi izolaţi Există „reţete" de calcul pentru parametri A şi B pentru toate perechile de atomi (grupe) în contact, de interes pentru interacţiile receptor–ligant. Caracteristic forţelor van der Waals este un potenţial atractiv de ordinul $\varepsilon_0 \cong 0{,}5$ kcal/mol per pereche în interacţia care apare la o distanţă de contact van der Waals $R_0 \cong 3\text{-}4$ Å, urmat, la scăderea lui R, de o creştere bruscă a energiei potenţiale. În general, la o scurtare de peste 0,5 Å, faţă de R_0, U_{vdW} creşte cu mult peste enegia termică medie (kT ≅ 0,6 kcal/mol). Forţele van der Waals, numite şi forţe de dispersie, sunt forţe cu bătaie scurtă (vezi figura 2).

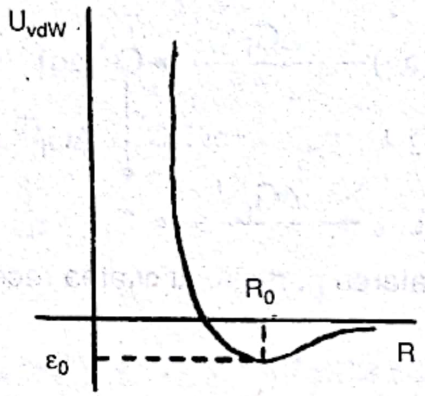


Figura 2

Interacţiile electrostatice sunt tratate şi ele aditiv în raport cu interacţiile între perechi de atomi. Făcând abstracţie de factorul de corecţie din SI, $1/4\pi\varepsilon_0$, pentru o pereche de atomi (ioni) cu sarcinile q_i şi q_j aşezaţi la distanţa R_{ij}, energia de interacţie coulombiană are forma:

$$U_{elst} = -\frac{q_i q_j}{D R_{ij}} \tag{7}$$

unde D este constanta dielectrică relativă a mediului, pentru interacţia a doi ioni cu sarcinile q_i,q_j, aşezaţi la o distanţă egală cu suma razelor ionice (circa 2 Å), U_{elst} atinge valori de ordinul 150 kcal/mol care, pentru o interacţie în mediu apos ($D_{H_2O} = 80$), se reduce la circa 2 kcal/mol.

Formula (7) din fizica clasică este valabilă în vid la distanţe mari în raport cu lungimea legăturilor chimice (1–2 Å), dar în soluţie–sau transmisă peste un spaţiu ocupat de alţi atomi, intervin fenomenele de polarizare. O „reţetă" pentru calculul lui D în diferitele situaţii reale este greu de dat. Este utilă, mai ales dacă partenerii de interacţie sunt molecule mici, introducerea forţelor tip *ion-dipol* şi *dipol-dipol.*

Scanned with OKEN Scanner

Făcând abstracţie de D, $1/4\pi\varepsilon_0$ şi factori legaţi de orientarea dipolilor, potenţialele de interacţie corespunzătoare pot fi scrise ca:

$$U_{ion-dipol} = -\frac{q_1\mu_2}{R_{12}^2};\quad U_{dipol-dipol} = -\frac{\mu_1\mu_2}{R_{12}^3} \qquad (8)$$

Aici, μ reprezintă momentul de dipol. Un câmp electric E_1 induce un dipol $\mu_2 = a_2E_1$ într-o sferă (atomi, ioni) de polarizabilitate a_2. Luând în considerare numai polarizarea partenerului cu a_2 mai mare, potenţialele de interacţie ion-dipol indus şi dipol-dipol indus sunt:

$$U_{ion-dipind} = -\frac{1}{2}\frac{a_2q_1^2}{R_{12}^4};\quad U_{dipol-dipind} = -\frac{1}{2}\frac{a_2\mu_1^2}{R_{12}^6} \qquad (9)$$

Distanţa R, în toate cazurile, nu trebuie să fie mai mică decât distanţa de contact van der Waals.

Punţile de hidrogen. Valorile tipice ale interacţiei dipol-dipol pentru molecule mai mici sunt de 0,1–0,5 kcal/mol. Ele ajung la 5 kcal/mol pentru aşa-numitele punţi de hidrogen. Acestea apar între o legătură X-H puternic polarizată (legături O-H, N-H, F-H) şi o pereche de electroni nepartiţipanţi ai unui atom electronegativ din perioada a 2-a (O, N, F) (vezi figura 3):

$$\overset{-\delta}{X} \longleftarrow \overset{+\delta}{H} \cdots : \overset{-\delta}{Y}$$

Figura 3

Distanţa X...Y este de 2,5–3 Å, mai mică decât distanţele de contact van der Waals obişnuite, iar distanţa dintre centrele dipolilor care interacţionează (vezi ecuaţia 8) – şi mai mică. Punţile de hidrogen sunt esenţiale în medii apoase. Molecula H_2O posedă două legături O-H şi două perechi de electroni neparticipanţi, putând forma punţi de hidrogen cu patru molecule de apă vecine. Aceasta duce la o puternică ordonare, la mică distanţă, a moleculelor de H_2O în apa lichidă.

Complecşii cu transfer de sarcină apar între molecule sau grupări de molecule cu un caracter donor de electron şi, respectiv, acceptor de electron marcat, energia de interacţie ajungând la 10–15 kcal/mol. Este vorba, în general, de molecule plane, care să ofere o bună suprafaţă de contact la interacţia van der Waals. Donori tipici sunt antracenul, anilina, mesitilena, fenolul, acceptori – nitrobenzenul, trinitrobenzenul, tetracianoetilena. Dintre aminoacizi – triptofanul (ciclul indolic) şi tirozina (restul fenolic) sunt donori de electroni. Acridina şi alţi compuşi aromatici se pot intercala între bazele azotate din elicea dublă DNA, formând, de asemenea, complecşi cu transfer de sarcină.

Scanned with OKEN Scanner

Deformarea moleculelor. În interacţia receptor-efector, o deformare a moleculei L_i şi/sau a situsului de combinare al lui R poate evita o nepotrivire sterică a celor doi parteneri şi poate aduce în contact grupe (de pe cei doi parteneri), care produc atracţii puternice bazate pe forţe intermoleculare. Scăderea interdistanţei (între doi atomi/grupe nelegate prin legături covalente) cu 1 Å sub distanţa de contact van der Waals produce o repulsie de multe zeci de kcal/mol (vezi egalitatea 6 – termenul B/R^{12}). Asemenea nepotrivire sterică se poate rezolva, în multe cazuri, prin deformarea unghiului diedru, de torsiune în jurul unei legături chimice. Dependenţa energiei, U_{tors}, de unghiul de torsiune φ, este:

$$U_{tors}(f) = 1/2V(1+ \cos n\varphi) \qquad (10)$$

Pentru legături tip C–C, bariera de rotaţie între conformaţiile intercalate $V \cong 3$ kcal/mol, n=3, iar o deplasare prin torsiune a atomului (grupei) cu 1 Å distanţă nu necesită o energie mai mare. Dacă evitarea unei nepotriviri sterice (suprapunerea anvelopei van der Waals a moleculei L_i cu cea a situsului combinant de pe R) se face prin trecerea lui L dintr-o conformaţie intercalată într-alta (tranziţie conformaţională „locală" în L_i sau R), consumul energetic necesar poate fi şi mai mic (vezi figura 4).

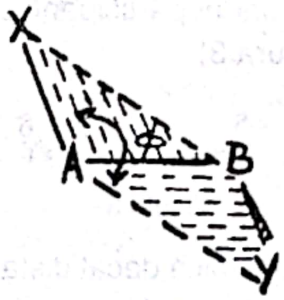


Figura 4

Efecte entropice. Entropia este o măsură a gradului de dezordonare, mărirea ordinii structurale dintr-un sistem ducând la scăderea ei. Apa lichidă are o marcată ordine la mică distanţă. Din cele patru punţi de hidrogen per moleculă de H_2O, la topire se rup 10-15% din ele. Apa lichidă poate fi aproximată cu o reţea cristalină cu o cifră de coordinaţie medie de circa 4,5, în care în jur de 10% din noduri sunt goale – permutaţia moleculelor H_2O între noduri şi goluri explicând entropia de topire ($\Delta S_{top} \cong 5,5$ cal/molK). Moleculele H_2O din solvent, în contact cu o suprafaţă nepolară, formează o structură mai ordonată decât cele din interiorul lichidului, ceea ce explică efectul entropic pozitiv în interacţii hidrofobe.

Crearea unei particule noi, de exemplu la disocierea $C \rightarrow A + B$ în soluţie apoasă, măreşte dezordinea, deci şi entropia. Dispariţia unei particule, de exemplu la interacţia $R + L_i \rightarrow C_i^*$, corespunde din acest punct de vedere la $\Delta S_{tr} \cong -10$ cal/molK, pentru concentraţia lui L_i de un mol/l. La aceasta se adaugă alte scăderi de

Scanned with OKEN Scanner

entropie, prin limitarea unor mişcări de rotaţie în complex (C*) a moleculei L_i, ΔS_{rot}. De asemenea, dacă din n conformaţii de joasă energie (practic, izoenergetice) ale lui L_i, prin combinarea cu R, este fixată o singură conformaţie, pierderea de entropie conformaţională este de:

$$-\Delta S_{conf} = -R \ln n \cong -4{,}5 \lg n \text{ (cal/molK)} \qquad (11)$$

Toate aceste efecte trebuie luate în consideraţie atât la interacţia receptor-efector, cât şi în considerente legate de structura spaţială (de regulă, corespunzătoare conformaţiei celei mai stabile) a moleculelor şi macromoleculelor. Ne vom referi la *energia conformaţională,* U_{conf} – folosită în mecanica moleculară la calculul energiei diferitelor conformaţii ale unei molecule şi la *interacţii hidrofobe* care favorizează scoaterea moleculelor de H_2O ale soluţiei din contact direct cu suprafeţe nepolare ale altor molecule (implicit cu punerea în contact direct a suprafeţelor nepolare), aglomerarea – scoaterea din soluţia apoasă a moleculelor nepolare.

Dintre tipurile de forţe intermoleculare descrise, interacţia electrostatică corespunde energiei perturbaţionale în primă aproximaţie ($E^{AB}_{(1)}$ din ecuaţia 2). Contribuţia polarizabilităţii la interacţia electrostatică, forţele tip van der Waals şi interacţia în complecşii cu transfer de sarcină corespund energiei perturbaţionale în a doua aproximaţie ($E^{AB}_{(2)}$ din ecuaţia 2). În ceea ce priveşte costurile energetice legate de deformarea moleculelor, ele se încadrează mai greu în schema perturbaţională, care implică interacţia între două molecule cu conformaţii fixe. Se consideră, de regulă, că aceste potenţiale de interacţie pot fi calculate, într-o bună aproximaţie, cu formule corespunzătoare fizicii clasice. Efectele entropice sunt o problemă de fizică statistică.

Mecanica moleculară

Este un domeniu nou, bazat pe tehnica modernă de calcul care, cu ajutorul unui set de formule aproximative pentru energia interacţiilor intermoleculare, aşa-numitul *câmp de forţe,* permite cu bune rezultate calculul energiilor conformaţionale şi, prin aceasta, prezicerea formei spaţiale (corespunzătoare conformaţiei de cea mai joasă energie) pentru molecule şi biomolecule. Pentru energia conformaţională U este folosită o formulă de tipul:

$$U = U^{elst} + U^{vdw} + U^{def} \qquad (12)$$

în care:

Scanned with OKEN Scanner

$$U^{elst} = \sum_{i>j}\sum \frac{q_i q_j}{DR_{ij}} \quad (12a); \quad U^{vdW} = \sum_{i>j}\sum \left(-\frac{A_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{B_{ij}}{R_{ij}^{12}} \right) \quad (12b)$$

$$U^{def} = \frac{1}{2}\sum_{\alpha} k_\alpha \left(l_\alpha - l_\alpha^0\right)^2 + \frac{1}{2}\sum_{\beta} k_\beta \left(\Theta_\beta - \Theta_\beta^0\right)^2 + \frac{1}{2}\sum_{\gamma} V_\gamma \left(1 + \cos n_\gamma \Phi_\gamma\right) \quad (12c)$$

R_{ij} este distanţa dintre atomii i şi j – nelegaţi prin legături covalente; q_i, q_j – sarcini atomice calculate printr-o metodă a chimiei cuantice; D – constanta dielectrică (adesea se ia D = 4, alteori D se ia în funcţie de interdistanţa R_{ij}); A_{ij} şi B_{ij} caracterizează interacţia van der Waals între perechi de atomi de diferite tipuri; cei trei termeni din (12c) caracterizează consumul de energie pentru deformarea lungimilor l_a a valenţelor, deformarea unghiurilor între valenţe, Θ_β şi, respectiv, deformarea unghiurilor diedre Φ_γ. Expresia lui U conţine o serie de termeni ajustabili (D, A_{ij}, B_{ij}); uneori, electronii neparticipanţi pentru punţi de hidrogen se consideră ca un „pseudoatom". Prin „etalonarea" acestor parametri ajustabili pe o serie de molecule standard, se obţin, pentru U, expresii care dau rezultate bune pentru molecule de anumite tipuri, chiar dacă, în exemplul pentru U descris aici, efectul polarizării nu este considerat explicit. Dificultatea unor calcule de acest tip este evidentă, de unde necesitatea de a se recurge la tehnica computaţională, în special, deoarece interdistanţele şi unghiurile (R_{ij}, l_a, Θ_β, Φ_γ) sunt interdependente.

Forţele hidrofobe apar în soluţie apoasă, în urma interacţiei între posibilitatea de formare de punţi de hidrogen între moleculele H_2O şi interacţiile de tip nepolar. Din punct de vedere al entalpiei libere G, contactul între moleculele H_2O şi suprafaţa nepolară (neformatoare de punţi de hidrogen) ale altor molecule este nefavorabilă. Efectul se poate evalua din valoarea tensiunii superficiale la interfaţa solvent nepolar: apă, care are valori în jurul a $\sigma = 20\text{-}25 \times 10^{-3}$ N/m, ceea ce corespunde la un câştig, în ΔG, de circa 30 cal/Å^2, pentru o reducere de 1 Å^2 a acestei interfeţe. Există tabele şi „reţete" pentru contribuţia la efectele hidrofobe a diferitelor grupe structurale din moleculele organice, bazate pe coeficienţii de partiţie octanol: apă, P_{oct}. Relaţia între ΔG pentru trecere din apă în mediu nepolar şi P_{oct} este:

$$\Delta G_{apa\ nepolar} \cong -2{,}3RT \log P_{oct} \quad (13)$$

Este mult utilizată aşa-numita hidrofobicitate a moleculei L_i, notată uneori π_i şi definită prin raportul concentraţiilor lui L_i în octanol, respectiv apă, când cele două soluţii (nemiscibile), în contact, ajung la echilibru:

$$\pi_i = \lg P(L_i);\ P(L_i) = [L_i]_{oct}/[L_i]_{apa} \quad (14)$$

Hidrofobicitatea π_i poate fi calculată prin scheme (notate de regulă **CLOGP**) bazate pe contribuţia aditivă a fragmentelor structurale, la care se adaugă termeni de corecţie pentru interacţii între asemenea fragmente.

Scanned with OKEN Scanner

În ceea ce privește relația cu formulele (4) și (5) pentru afinitatea receptor-ligand (efector), ΔG_i și energia de interacție a speciilor R și L_i deshidratate, se poate scrie că:

$$\Delta U_{RL_i} = \Delta U_{RL_i}^{elst} + \Delta U_{RL_i}^{vdW} + \Delta U_R^{def} + \Delta U_{L_i}^{def} \qquad (15)$$

Dacă nu au loc deformații ale celor doi parteneri la formarea complexului C*, primii doi termeni corespund expresiilor (12a) și (12b), unde atomii „i" se află pe situsul de combinare al lui R, atomii „j" – pe molecula L_i. În ceea ce privește efectul deshidratării parțiale, $\Delta GR_{L_i}^{desh}$, acesta – împreună cu interacția van der Waals între R și L_i – va fi legat de interacții hidrofobe; în general, situsul de combinare al lui R va fi mult mai puțin polar decât moleculele de apă, în care se află molecula L_i.

Modelarea moleculară. Dinamica moleculară

Modelarea moleculară. Dezvoltarea tehnicilor de calcul, a programelor, a facilităților de reprezentare grafică și de interacție utilizator-calculator a permis realizarea unor tehnici noi de studiere a interacției între molecule și biomolecule, tehnici încorporate, de regulă, în termenul modelare moleculară.

Un prim domeniu, cel al *mecanicii moleculare,* este legat de găsirea conformațiilor de energie minimă, a formei spațiale a moleculelor și biomoleculelor. Prin reprezentarea grafică (display graphics) se poate calcula energia unei conformații anumite, cât și barierele pentru trecerea de la o conformație la alta. Dacă este vorba de molecule izolate (uneori – și în cristal) se folosesc câmpuri de forțe de tipul dat de ecuațiile (12 – 12c). Mai dificilă este problema moleculelor în soluție – de regulă, apoasă. Se recurge uneori la „plimbarea" unei molecule H_2O în jurul anvelopei van der Waals a moleculei în cauză. Alteori, apa se consideră ca mediu continuu, cu o constantă dielectrică, D, și se calculează energia corespunzătoare efectelor de polarizare.

Dinamica moleculară simulează sistemele moleculare în mișcare. Atomii din moleculele studiate se consideră că execută mișcări controlate de ecuația lui Newton din mecanica clasică. Forța ce acționează asupra unui asemenea atom se obține din derivarea, în raport cu coordonatele spațiale ale atomului, a energiei potențiale U de tip (12 – 12c). Trebuie date și coordonatele inițiale ale atomilor (care depind, evident, și de structura moleculei în cauză) și, de regulă, sistemul se „încălzește", atribuindu-se, aleator, diferite viteze acestor atomi, însă astfel ca energia cinetică a sistemului să corespundă energiei cinetice medii la temperatura ambiantă. Poate fi studiată, astfel, interacția cu moleculele H_2O din soluție. Evident,

Scanned with OKEN Scanner

mărimea biomoleculei studiate și numărul de molecule H_2O din sistem este limitat de puterea de calcul.

Tehnicile de mecanică moleculară permit să se calculeze energia de interacție între o moleculă și un situs receptor biologic, dacă structura spațială a situsului este cunoscută în urma unor studii de cristalografie cu raze X și RMN. În ceea ce privește calculul afinității situs-ligand, acesta este îngreuiat de intervenția fenomenelor de hidratare-deshidratare. Se poate însă calcula diferența, $\Delta\Delta G$, între afinitățile pentru un situs receptor (cu structură cunoscută) a doi liganzi diferiți (L_i, L_j), prin așa-numita *metodă de perturbație a energiei libere,* bazată pe tehnicile utilizate în dinamica moleculară.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Literatură generală pentru caracteristicile sistemelor vii:

a) Watson J. D. (1974) *Biologia moleculară a genei,* Editura Științifică, București;

b) Alberts B., Bray D., Lewis L., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (1989) *Molecular Biology of the Cell*, 2nd ed., Garland, New York.

2. Literatură generală pentru forțe intermoleculare:

a) Simon Z. (1973) *Biochimie cuantică și interacții specifice,* Editura Științifică, București, cap. 3;

b) Webb J. L. (1963) *Enzymes and Metabolic Inhibitors,* Academic Press, New York, cap. 6;

c) Leo A., Hansch C., Elkins D. (1971) Partition coefficients and their use. *Chem Rews,* 71:525.

3. Literatură generală pentru mecanică și modelare moleculară:

a) Cohen N. C., Blaney J. M., Humblet C., Gund P., Barry D. C. (1990) Molecular modelling software and methods for medicinal chemistry, *J Med Chem,* **33**:88;

b) McCammon J. A. (1987) Computer aided molecular design. *Sciens,* **238**:486;

c) Dean M. P. (1987) *Molecular Foundations of Drug-Receptor Interaction,* Cambridge Univ Press, Cambridge.

Scanned with OKEN Scanner

STRUCTURA BIOMACROMOLECULELOR

L. KURUNCZI ŞI Z. SIMON

Introducere

Funcţia biologică a biomacromoleculelor depinde puternic de structura spaţială (conformaţia) a acestora. Practic, numai „conformaţia nativă" posedă o anumită funcţie biologică (de exemplu, activitatea enzimatică). Aceste biomacromolecule sunt proteinele, acizii nucleici (DNA, RNA), polizaharidele. Structura spaţială a acestora, în special a proteinelor, este determinată, în condiţiile de mediu existente în celula vie, de către structura primară a genei care codifică proteina respectivă.

Se vorbeşte de o *structură primară,* în sensul secvenţei resturilor monomere în biomacromoleculă (de exemplu, secvenţa aminoacizilor în lanţul polipeptidic).

Structura secundară se referă la relaţiile spaţiale între resturi monomere vecine, apropiate din punct de vedere al structurii primare.

Structura terţiară şi *cuaternară* se referă la forma spaţială a întregii biomacromolecule sau a complexului de biomacromolecule (se vorbeşte de structura terţiară, în cazul unui polipeptid, şi de structura cuaternară a unei proteine formate din două sau mai multe polipeptide). S-ar mai putea vorbi şi de structura nivelurilor superioare de organizare – de exemplu, ribozomii, formaţi din câteva zeci de molecule de proteine şi RNA. Ansamblurile membranare formate, de regulă, din aproximativ 50% proteine şi 50% fosfolipide, la care se adaugă proporţii variate de polizaharide, colesterol, au în mare măsură structura unor cristale lichide bidimensionale. Ele permit difuzia bidimensională (pe suprafaţa membranei) a moleculelor şi biomacromoleculelor aşezate pe suprafaţa membranei, cât şi a celor care trec de-o parte şi de alta a membranei.

Structura proteinelor

Din punct de vedere al structurii spaţiale globale, proteinele se clasifică, după raportul axelor principale, în – *proteine globulare,* raport lungime: lăţime apropiat de 1, de regulă maximum 3–4. Exemple sunt insulina, proteinele plasmatice,

Scanned with OKEN Scanner

globulinele, enzime etc.; – *proteine fibrilare,* cu raport lungime: lăţime mai mare decât 10. Astfel sunt keratina, miozina, colagenul, fibrina.

Proteinele sunt de fapt polipeptide (monomere sau homo/hetero-di şi tetramere) cu greutăţi moleculare mari (M ≥ 8000 ÷ 10 000). Ele se mai clasifică în *proteine simple,* care conţin numai aminoacizi, şi *proteine complexe,* care mai conţin vitamine, lipide, zaharide etc.

Monomerii proteinelor sunt aminoacizii. Din cei circa 300 de aminoacizi naturali, numai 20 L – α aminoacizi apar în proteine. Structura generală a restului aminoacidic este redată în figura 1.

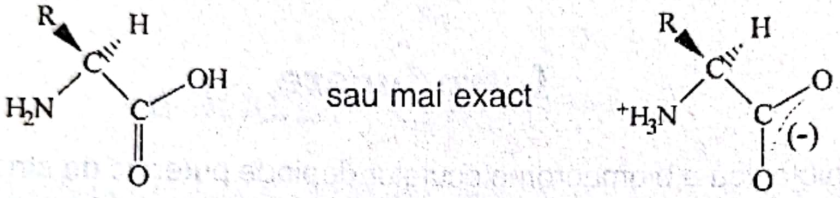


Figura 1

Peptidele sunt formate din minimum doi aminoacizi legaţi prin legătură peptidică. De exemplu, alanil – cisteinil – valina (Ala – Cys – Val) are următoarea structură:

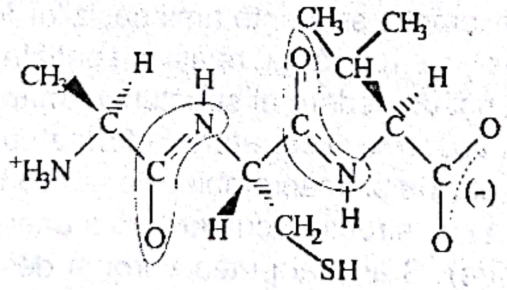


Figura 2

Legătura peptidică este, de regulă, în conformaţie trans. Direcţia convenţională de numerotare a aminoacizilor este de la capătul N-terminal spre capătul C-terminal. Mai multe tipuri de forţe sunt implicate în asamblarea proteinelor. *Legăturile covalente* peptidice determină structura primară, iar cele disulfidice (–S–S–) intervin în structura terţiară şi cuaternară. Legăturile peptidice sunt rigide (parţial duble), spre deosebire de celelalte legături covalente, care sunt mai flexibile (legături simple). *Punţile de hidrogen* intralanţ, uneori şi interlanţ, sunt importante, în special, pentru structura secundară. *Interacţiunile hidrofobe* şi cele *electrostatice,* între catenele aminoacidice laterale, **R**, sunt importante, în special, pentru structura terţiară şi cuaternară.

Scanned with OKEN Scanner

Conformaţia unităţilor peptidice

Structura spaţială a lanţului peptidic este caracterizată prin unghiurile diedre Φ (C – N – C_α – C) şi Ψ (N – C_α – C – N) specificate în figura 3. Calculele pentru dipeptide arată că proprietăţile rotaţionale (minimele în raport cu) Φ, Ψ sunt determinate în special de catena laterală **R** (legată de C_α) şi nu depind mult de celelalte reziduuri.

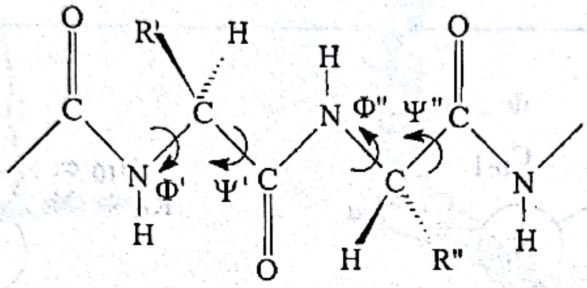


Figura 3

Calculele pentru tripeptide pun în evidenţă un minimum adiţional, determinat de formarea unei legături de hidrogen. Se formează aşa-numitul *U-turn* [U_{10}], alcătuit dintr-un ciclu de 10 atomi, închis printr-o legătură de hidrogen.

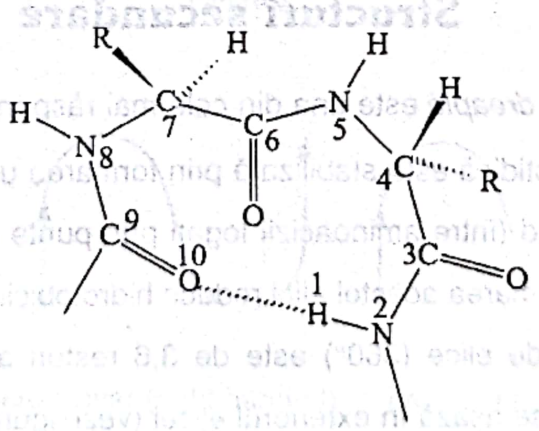


Figura 4

Calcule energetice, cu considerarea atomilor nelegaţi (pentru homopolipeptide, rest aminoacidic izolat şi rest aminoacidic din dipeptid), pun în evidenţă cinci minime de energie conformaţională pentru schelet, din care rămân patru, dacă se ţine seama de posibilitatea de formare de punţi de hidrogen. Acestea sunt redate în tabelul 1 şi figura 5:

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 1

	Φ	Ψ
cis (instabil)	0	0
R_α	–60	–60
β	–150	150
U_{10}	–60	–30
L_α	60	60

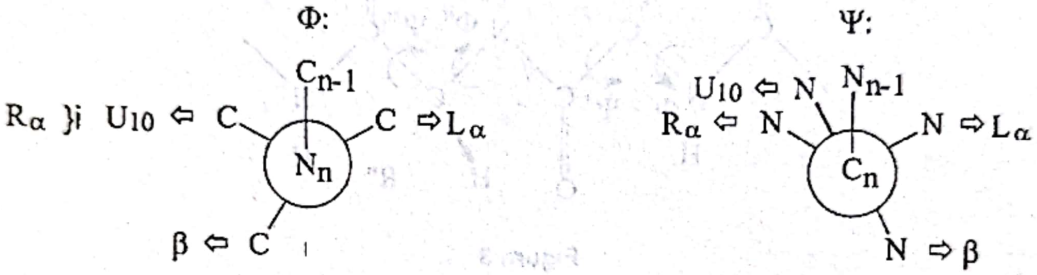


Figura 5

Structuri secundare

R_α: *- elicea α – dreaptă* este una din cele mai răspândite structuri secundare. Fiecare legătură peptidică este stabilizată prin formarea unei punţi de hidrogen cu al patrulea aminoacid (între aminoacizii legaţi prin punte de hidrogen se interpun trei reziduuri, **R**). Formarea acestei elici reduce hidrofobicitatea în zona scheletului. Înaintarea per tură de elice (360°) este de 3,6 resturi aminoacidice sau 5,44Å. Catenele laterale R se aşază în exteriorul elicei (vezi figura 6).

β:-*conformaţia β-pliată* are ca factor stabilizator formarea de legături de hidrogen între lanţuri, de orientare antiparalelă sau paralelă (vezi figura 8). Topologic, între porţiuni liniare ale aceleiaşi catene polipeptidice se pot forma conformaţii β în trei cazuri: hairpin, cross-over left şi right-handed.

Scanned with OKEN Scanner

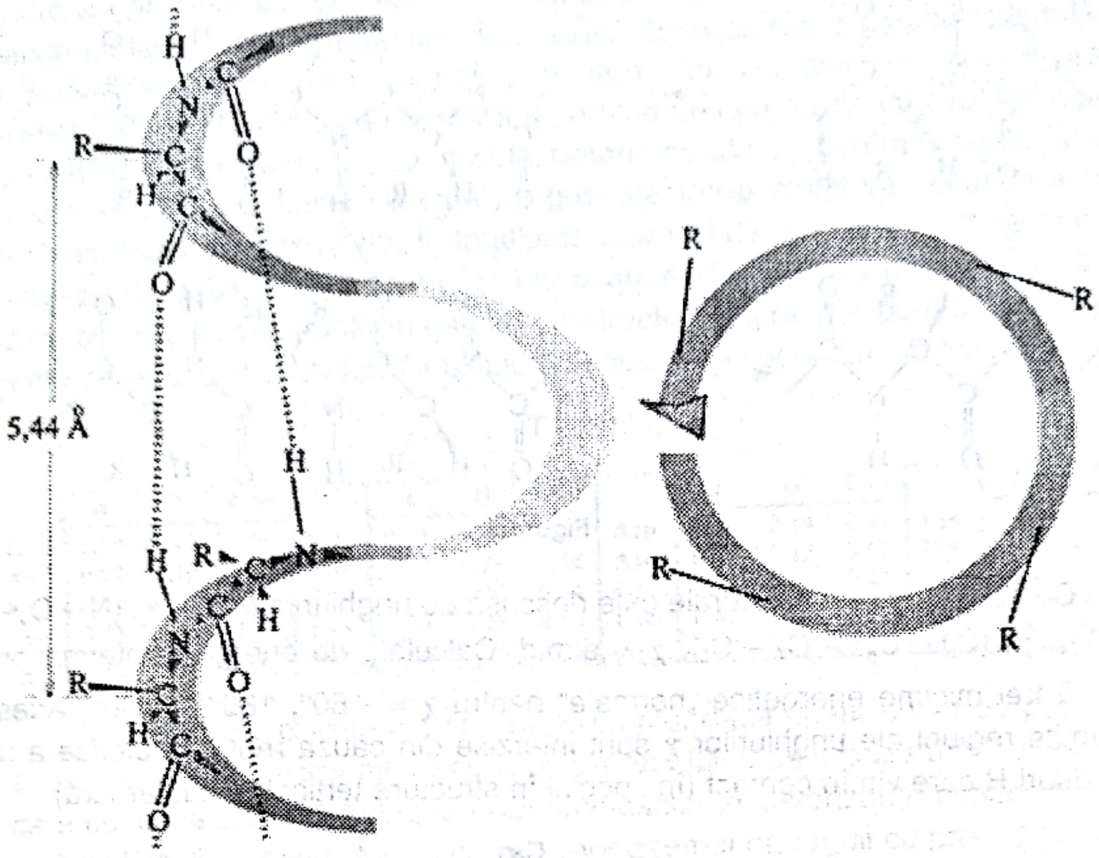


Figura 6

hairpin (agrafă) | crossover (right handed) (peste plan) | crossover (left handed) (sub plan)

Figura 7

O turnură hairpin (agrafă) poate avea „sub ea" și o structură elice α, nu numai β-pliat antiparalelă.

Scanned with OKEN Scanner

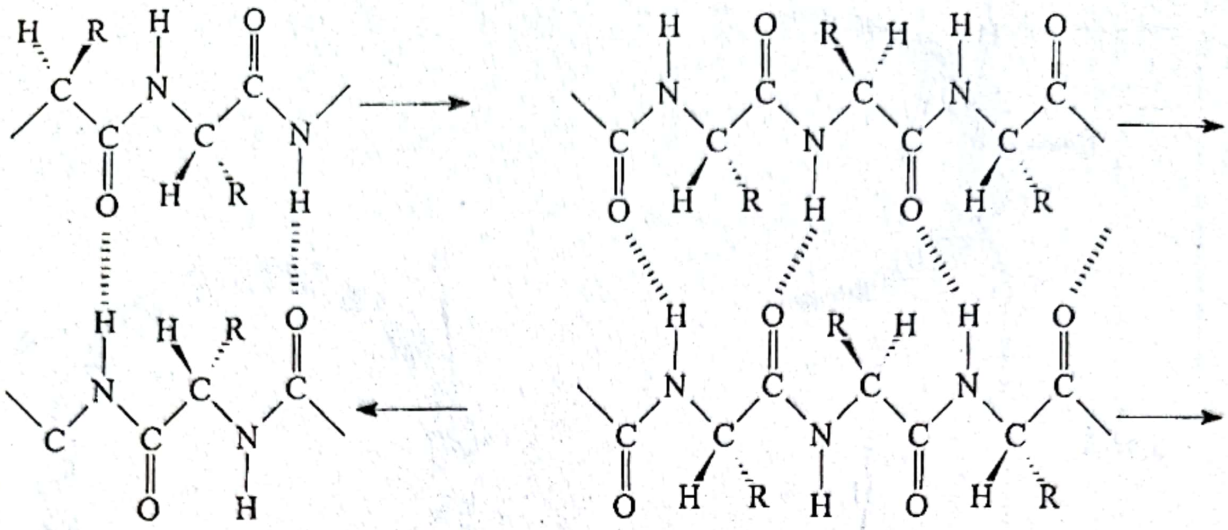


Figura 8

Conformația catenei laterale este descrisă de unghiurile diedre χ_1 ($N - C_\alpha - C_\beta - C_\gamma$), χ_2 ($C_\alpha - C_\beta - C_\gamma - C_\delta$), χ_3 ș.a.m.d. Calculele de energie conformațională indică trei minime energetice „normale" pentru χ = - 60°, 180° și +60°. Adesea, anumite regiuni ale unghiurilor χ sunt interzise din cauza repulsiei sterice a unor reziduuri R care vin în contact (în special în structura terțiară și cuaternară).

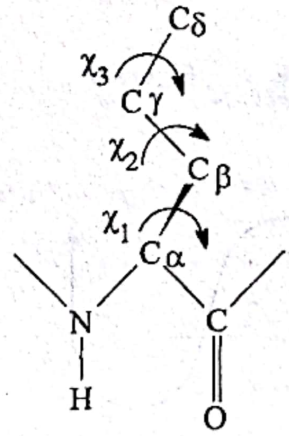


Figura 9

Predicția structurii spațiale a proteinei din structura primară

Structura spațială „nativă" a unei proteine, în cursul biosintezei acesteia pe ribozom, este determinată de mesajul genetic al genei care o sintetizează, deci de structura sa primară. S-a pus problema prezicerii structurii globale a proteinelor din

Scanned with OKEN Scanner

structura primară, primul pas fiind *prezicerea structurii secundare* [2]. Într-o primă etapă se face evaluarea, pentru fiecare rest aminoacidic, a caracterului favorizant (+), defavorizant (–) sau neutru (~) în raport cu structurile secundare ordonate (α-helix, β-sheet). Aceasta s-a realizat pornind de la proteine cu structurile primară şi spaţială (secundară etc.) cunoscute, determinându-se, pentru fiecare rest aminoacidic, frecvenţa relativă cu care se găseşte într-o structură secundară α-helix, β-sheet sau mai neregulată. În tabelul 2 este redată, pentru cei 20 de aminoacizi naturali, probabilitatea de a-i găsi într-o anumită structură (elice α, pliuri β sau dezordonată – coil), conform datelor de structură de raze X pentru câteva zeci de proteine, având în total 2437 reziduuri cu structură secundară cunoscută [3]:

Tabelul 2

	α	β	Coil		α	β	Coil		α	β	Coil		α	β	Coil
Gly	0,19	0,15	0,66	**Ser**	0,28	0,15	0,57	**Asp**	0,35	0,14	0,51	**Lys**	0,38	0,11	0,51
Ala	0,52	0,16	0,32	**Thr**	0,29	0,24	0,48	**Asn**	0,26	0,12	0,62	**His**	0,45	0,12	0,43
Val	0,41	0,28	0,31	**Tyr**	0,22	0,24	0,54	**Glu**	0,55	0,04	0,41	**Phe**	0,40	0,21	0,39
Leu	0,48	0,21	0,31	**Cys**	0,28	0,22	0,50	**Gln**	0,42	0,25	0,33	**Trp**	0,41	0,20	0,39
Ile	0,36	0,29	0,35	**Met**	0,48	0,29	0,28	**Arg**	0,28	0,17	0,55	**Pro**	0,21	0,17	0,62

S-au încercat diferite reguli – de exemplu, dacă apare un şir de patru aminoacizi „favorizanţi" (separaţi de cel mult un rest Gly), se iniţiază un segment α-helix care continuă până la apariţia a doi aminoacizi „defavorizanţi" consecutivi sau un rest de Pro. S-a încercat şi stabilirea unor asemenea reguli cu procedeul „reţelelor neuronale", bazate pe metode de „învăţare" computerizată. Succesul, în stabilirea tipului de structură secundară în care se află un anumit aminoacid într-un polipeptid oarecare, pare să nu depăşească 70%. O explicaţie posibilă este că un rest aminoacidic din polipeptid nu interacţionează numai cu resturi apropiate ca structură primară, ci, în urma interacţiei provocate de structura globală, terţiară şi cuaternară, şi cu resturi distanţate ca structură primară, sau aflate pe polipeptide diferite. Pentru a demonstra aceasta s-a introdus, prin inginerie genetică, o aceeaşi secvenţă de 11 aminoacizi, în două poziţii diferite ale structurii primare ale unei proteine (GB1). În cele două proteine rezultate, deşi au o structură globală foarte asemănătoare cu proteina nativă (GB1), secvenţa de 11 aminoacizi formează în una din poziţii o structură de elice α şi, respectiv, de structură β-pliată în cealaltă poziţie [4].

Prezicerea structurii terţiare şi cuaternare o implică pe cea secundară. În ceea ce priveşte structura spaţială, discernarea unei structuri de *proteină globulară* de cea de *proteină fibrilară* constituie un prim pas. Din acest punct de vedere, determinanţi sunt doi parametri: a). hidrofobicitatea catenelor laterale **R** şi b). sarcina electrică (la pH = 7) a acestor catene. În proteinele globulare, majoritatea catenelor **R** hidrofobe se află în interiorul globulei, formând un fel de „picătură de ulei" şi fiind scoase din contactul direct cu moleculele H_2O înconjurătoare. Catenele

Scanned with OKEN Scanner

R hidrofile sau încărcate electric sunt aşezate pe suprafaţa exterioară. Evident, un raport ridicat între suma peste hidrofobicitatea catenelor R şi sarcina (suma valorilor absolute) acestora va favoriza o structură globulară, iar un raport scăzut, o structură fibrilară.

Regiunile puternic hidrofile se află pe suprafaţa proteinelor; ele formează majoritatea determinanţilor antigenici ai proteinelor.

Nu există însă o metodă cât de cât sigură pentru stabilirea structurii spaţiale globale. Pentru obţinerea structurii din studii de raze X pe cristale de proteine sau studii RMN bidimensionale în soluţie, este necesar să se pornească de la un model structural; se prezice interferograma **RX** sau spectrul **RMN,** iar neconcordanţele se corectează prin modificări ale modelului până la concordanţă. Modelul iniţial se obţine prin compararea cu proteinele înrudite, cu omologie marcată în structura primară, cu structura spaţială deja descifrată. Regulile aproximative pentru structura secundară şi terţiară se utilizează şi ele.

Determinarea cinetică sau termodinamică a structurii proteinelor

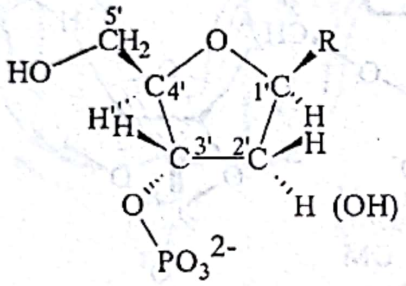
Posibilitatea unei renaturări a polipeptidului denaturat ar favoriza o determinare termodinamică a structurii spaţiale. Proteinele mici, cum ar fi lizozimul ($M \cong 15$ kDa) revin din starea denaturată în cea nativă în timpi de ordinul secundelor. Replierea începe cu reformarea „slow exchange core" – zone globulare, marcat hidrofobe care, fiind relativ ecranate de soluţie, schimbă lent protonii din NH–peptidic cu ionii H_3O^+ şi HO^- din soluţie (pH = 3 ÷ 8). Ordinea replierii diferitelor zone este inversă vitezei de schimb de protoni NH în proteina nativă. Ar fi posibil ca, evolutiv, să fi supravieţuit proteinele în care forma nativă să fie şi cea termodinamic stabilă şi totodată cinetic stabilă (din punct de vedere al aşezării zonelor puternic hidrofobe) [5]. O anumită cale cinetică pentru renaturare este necesară; în principiu, cu patru minime per rest aminoacidic (în raport cu unghiurile Φ, Ψ); pentru un polipeptid format din N resturi aminoacidice, cu 4^N conformaţii principial posibile, timpul necesar „găsirii accidentale" a minimului absolut ar ajunge oricum astronomic ($4^N \cong 10^{0.6N}$ – de exemplu pentru N = 100, avem $10^{60} * \tau$ (pentru tranziţie conformaţională) $\rightarrow \infty$). În cazul proteinelor cu masă moleculară mare, plierea lanţului nascent din ribozom nu pare un proces spontan. Multe proteine au un propeptid amino-terminal, esenţial pentru plierea corectă a proteinei, care este însă excizat din proteina matură. Esenţiale pentru prevenirea agregării polipeptidelor nou sintetizate şi pentru plierea corectă sunt şi aşa-numitele *chaperone* („domnişoare de companie"), proteine care acţionează prin combinarea cu lanţul peptidic nascent şi catalizarea plierii corecte a acestuia, proces care uneori necesită hidroliza ATP ca sursă energetică. Unele proteine din clasa Hsp (heat shock proteins) au rol de chaperone. Spre exemplu, Hsp70 din *E. coli* (0,1 μM) duce la plierea corectă a proteinei DnaK nascente

Scanned with OKEN Scanner

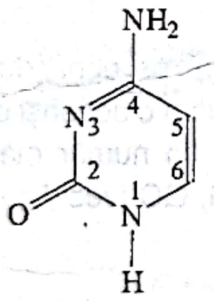
(2 μM), în timp de 0,4 s la 25°C – fiind necesară prezența ATP pentru formarea complexului chaperonă-lanț nativ și eliberarea proteinei corect pliate. Tot chaperonă este considerată și calnexina (neînrudită cu Hsp), care intervine în asamblarea în reticulul endoplasmic a proteinei MHC clasa I – un oligoheteromer format dintr-o catenă grea și β2 – microglobulina. Chaperone sunt considerate și proteinele care dirijează o proteină nativă de export spre aparatul Golgi, specializat în „exportul" de proteine din interiorul celulei [6].

Acizii nucleici. DNA și RNA

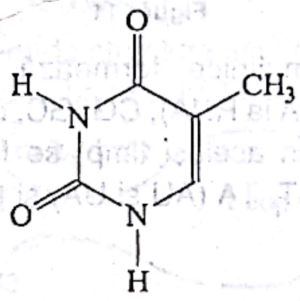
Sunt nucleotide (dezoxiribo- și, respectiv, ribo-) polimerizate prin punți 3', 5' – fosfodiesterice. Structura unei nucleotide cu sarcinile dominante la pH = 7 și a celor patru, cinci baze azotate este redată în figura 10.



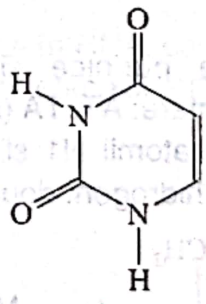
R:



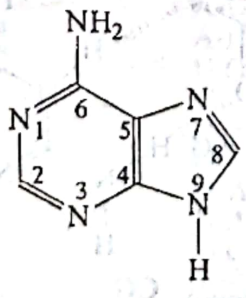
C (citozina)



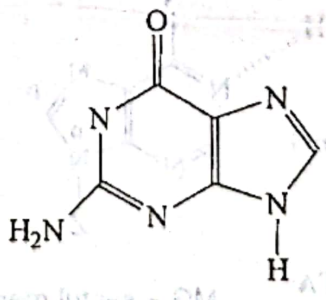
T (timina)



U (uracilul)



A (adenina)



G (guanina)

Figura 10

Scanned with OKEN Scanner

Dintre cele patru, cinci baze azotate R, în DNA se găsesc C, T, A, G, iar în RNA, C, U, A, G. Bazele pirimidinice intră în legătura N-glicozidică (unde se leagă de C1' al pentozei) prin N1, bazele purinice prin N9. În polimeri, RNA și DNA, structura primară a lanțului se scrie în direcția 5' – 3' (vezi figura 11).

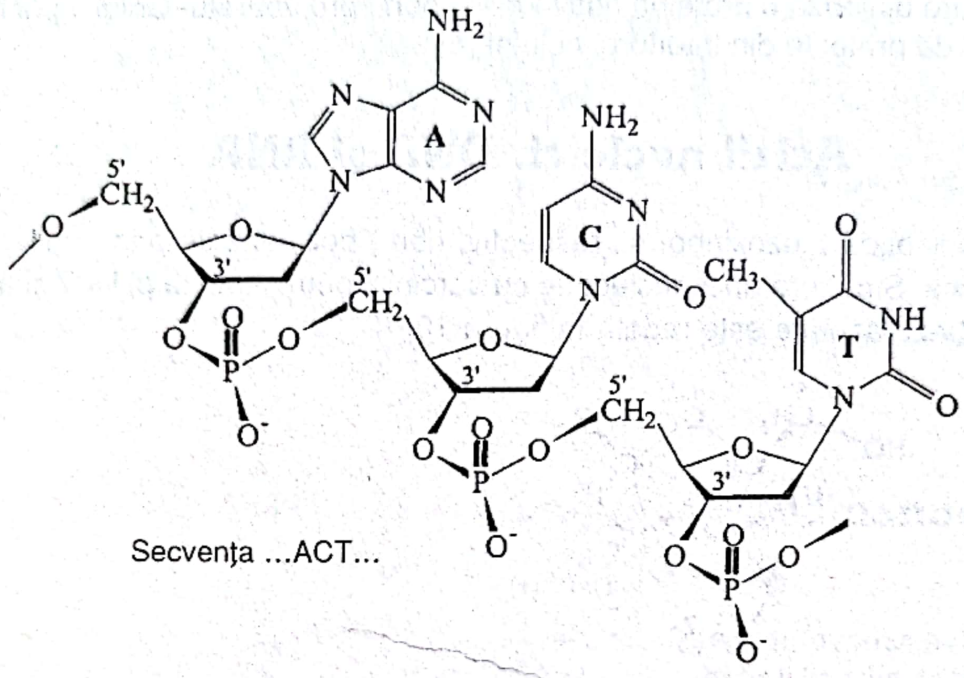
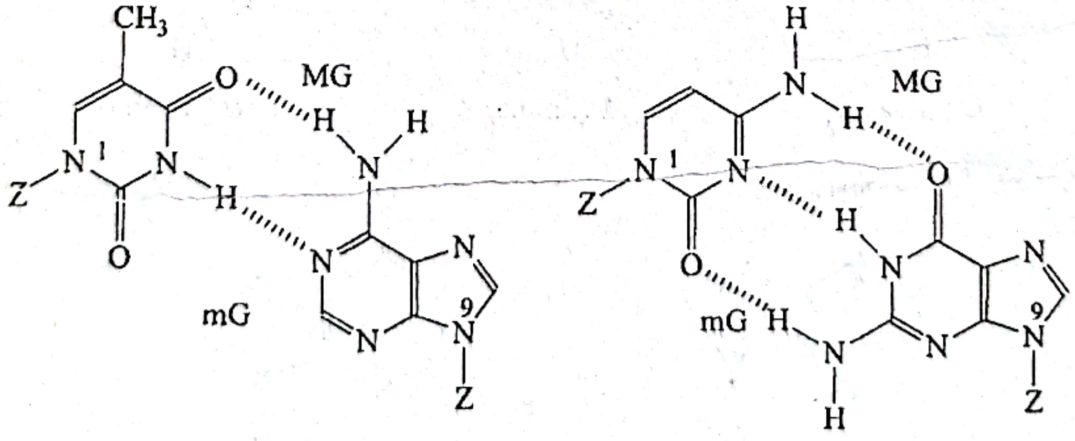


Figura 11

Bazele purinice și pirimidinice formează între ele perechi de baze complementare: AT, TA (AU, UA la RNA), CG, GC, care prezintă o aceeași distanță (11Å) între atomii N1 și N9. În același timp, se formează un număr maxim de legături de hidrogen: două în AT, TA (AU și UA) și trei în CG, GC (vezi figura 12).



MG – șanțul mare (major grove)
mG – șanțul mic (minor grove)

Figura 12

Scanned with OKEN Scanner

Bazele C, T, U, G sunt redate în forma ceto-imidică, predominantă în raport cu cea enolică, cu circa 5 kcal/mol (G ceto în comparaţie cu G enol).

Structura secundară cea mai răspândită la DNA, prezent de regulă ca două lanţuri complementare, este cea de *elice dublă*, în special forma B, cu un pas de 10 perechi de baze, pe o înălţime de circa 34 Å şi un diametru de circa 20 Å . Cele două lanţuri complementare sunt antiparalele. Lanţul pentozofosfatic este situat la exterior, perechile de baze la interior, cu planurile perpendiculare pe axa lungă a elicii duble (vezi figura 13). Elicea dublă prezintă două „şanţuri", şanţul mare (major groove, MG) şi şanţul mic (minor groove, mG). Moleculele din soluţia exterioară intră în contact în MG cu grupările „de sus" ale perechilor de baze (TA:CH_3, O, HNH, N etc.), iar în mG cu grupările „de jos" ale bazelor (TA: O, N; CG: O, HNH, N etc.).

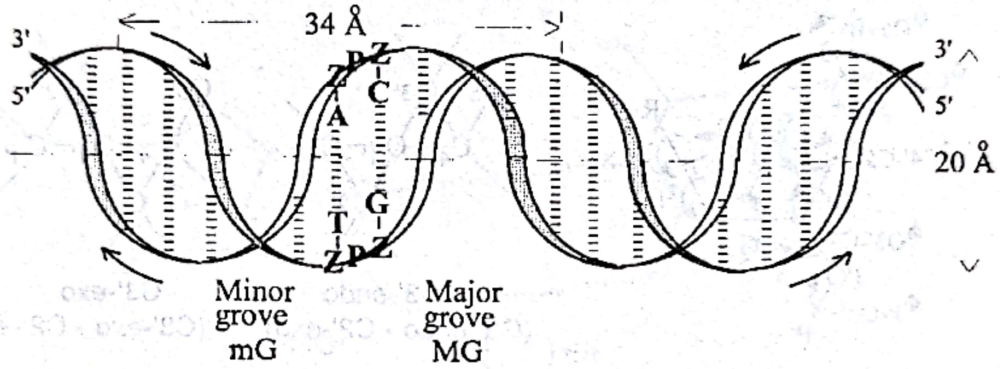


Figura 13

Elicea dublă apare ca element de structură secundară şi în RNA, chiar dacă în porţiunile de elice dublă nu toate bazele juxtapuse sunt complementare (vezi figura 14).

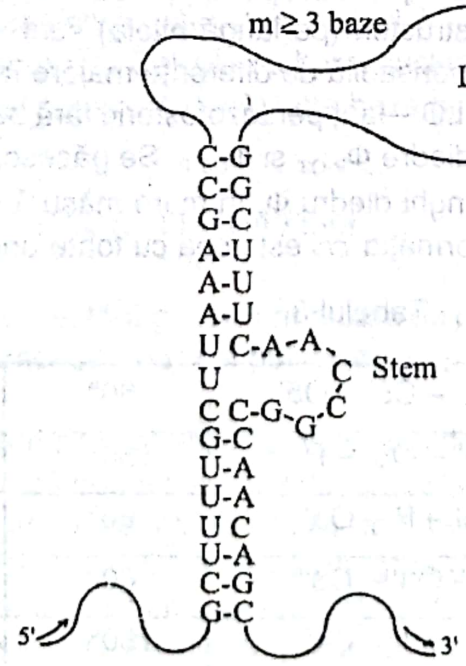


Figura 14

Scanned with OKEN Scanner

În general, moleculele de mRNA apar ca un amestec de porţiuni de elice dublă, de ghem haotic (random coil), bucle care „închid" o porţiune de elice dublă sau trunchiuri (stems) care ies ca o umflătură, reprezentând porţiunea necomplementară dintr-un singur lanţ („ieşind" din porţiunea elice dublă). Se aminteşte că elicea dublă are, în afară de forma B, şi alte două forme, A şi Z, mai rar întâlnite în celula vie. Orientarea în raport cu diferitele unghiuri diedre ale lanţului pentozofosforic condiţionează sau sunt condiţionate de structura secundară adoptată. Este vorba de unghiul χ_{CN}, care redă orientarea bazei în raport cu legătura N-glicozidică, unghiurile τ – din structura ciclului pentozic – şi unghiurile Φ pentru legăturile C – O, O – P, P – O. Structura scheletului este prezentată în figura 15.

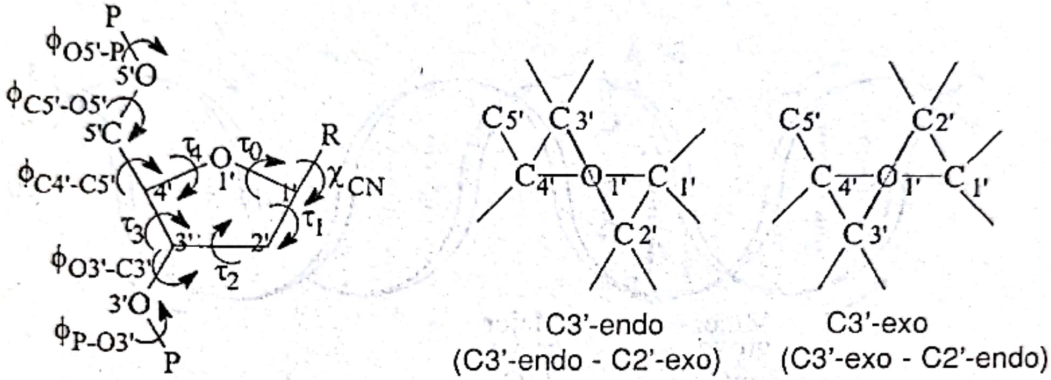


Figura 15

Ciclul pentozic este necoplanar; structura *endo* are atomul C3', de partea lui C5', iar structura *exo* are C3' de partea opusă lui C5'. Calcule de energie conformaţională arată că aceste structuri (pe lângă altele) sunt stabile energetic. Decoplanarizarea ciclului este responsabilă de diferenţe majore în structura elicei.

Calcule cuantice (metoda PCILO – lanţ pentozofosforic fără baze) arată că cea mai flexibilă parte sunt unghiurile diedre $\Phi_{P\text{-}O3'}$ şi $\Phi_{O5'\text{-}P}$. Se găsesc, din calcul, două minime principale pentru fiecare unghi diedru Φ, în mare măsură independente de structura pentozei (tabelul 3, conformaţia *cis* este cea cu toate unghiurile $\Phi = 0$).

Tabelul 3

$\Phi_{C4'\text{-}C5'}$	C3' – C4' – C5' – O5'	60°	180°
$\Phi_{C5'\text{-}O5'}$	C4' – C5' – O5' – P	180°	180°
$\Phi_{O5'\text{-}P}$	C5' – O5' – P – O3'	60°	-60°
$\Phi_{P\text{-}O3'}$	O5' – P – O3' – C3'	60°	-60°
$\Phi_{O3'\text{-}C3'}$	P – O3' – C3' – C4'	180°	180°

Scanned with OKEN Scanner

Rezultă un mare număr de conformaţii posibile, celălalt factor major în determinarea conformaţiei scheletului (deci a elicei) fiind rotaţia în jurul unghiului χ_{CN} (O1' – C1' – N1 – C6 în pirimidine şi O1' – C1 – N9 – C8 în purine). Pentru $\chi_{CN} = 0$ avem conformaţie *cis*. Prin calcule se găsesc în principal trei minime: $\chi_{CN} \cong 0°$ anti, $\chi_{CN} \cong +90°$ high anti şi $\chi_{CN} \cong -90°$ syn. În ambele conformaţii anti, atomii bazei se găsesc în partea opusă ciclului pentozic, iar în syn, aproximativ deasupra ciclului.

O caracteristică a structurilor dublu-helix este orientarea perechilor de baze opuse (şi legate prin legături de hidrogen), diferenţiabile, faţă de axa helixului, prin trei unghiuri: twist (între perechile de baze succesive), roll şi tilt (evidenţiate în figura 16).

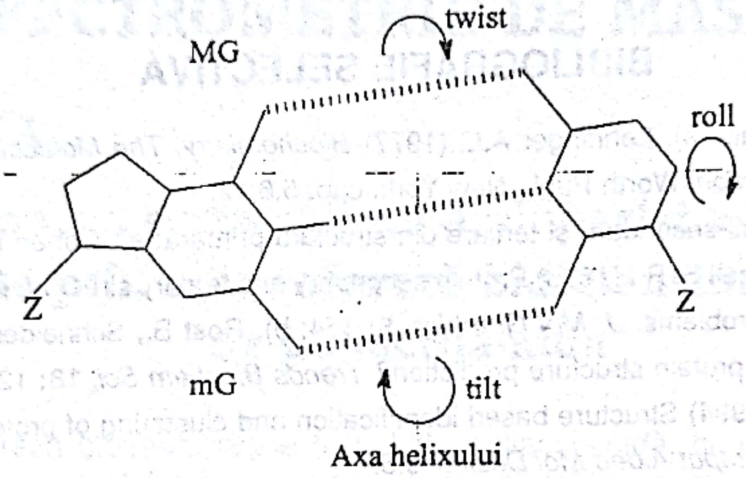


Figura 16

O altă caracteristică este „stacking"–ul, interacţii ce apar între perechi de baze aproximativ suprapuse. Calcule cu homonucleotide arată că interacţia între bazele purinice este mai puternică decât între baze pirimidinice:

$$\uparrow \begin{matrix} CG \\ GC \end{matrix} \downarrow \quad \Delta G_{stk} \cong -11 \text{ Kcal / mol} \qquad \uparrow \begin{matrix} TA \\ AT \end{matrix} \downarrow \quad \Delta G \cong -5 \text{ Kcal / mol}$$

Planele laterale, fără grupe formatoare de punţi de hidrogen, sunt scoase astfel din contactul direct cu apa (cel puţin parţial) prin stacking – care este o interacţie hidrofobă.

Pentru lanţuri polinucleotidice, calculele de hărţi energetice demonstrează că unitatea monomeră poate corespunde numai la un set limitat de conformaţii. Datele experimentale arată că elicea dublă are trei forme: B – dominant în condiţii fiziologice (concentraţie mică de săruri, grad de hidratare mare); A – grad mic de hidratare, concentraţie mare de ioni Na^+ şi K^+; Z – apare în cazul unor secvenţe repetitive GC sau AC (în general, purină – pirimidină), în prezenţă de săruri în

Scanned with OKEN Scanner

concentraţie mare sau prin legarea unor proteine specifice. Caracteristicile spaţiale ale acestor structuri sunt redate în tabelul 4.

Tabelul 4

	Helix	Perechi baze/spiră	Înaintare per pereche baze	Diametru helix	Twist
B	R	10	3,34 Å	~ 20 Å	36°
A	R	11	2,56 Å	~ 23 Å	33°
Z	L	12	3,71 Å	~ 18 Å	15°, 45°

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Referinţe generale: a). Lehninger A.L. (1977) *Biochemistry. The Molecular Basis of Cell Structure and Function,* Worth Publ., New York, cap. 5,6,12.

2. Predicţia structurii secundare şi terţiare din structura primară: a). Cohen F. E., Cohen B. I., Collach N., Presnell S. R., (1995) Protein secondary and tertiary structure predictions, new methods and old problems. *J. Mol Graphics,* **8:** 154; b). Rost B., Schneider R., Sander C. (1993) Progress in protein structure prediction? *Trends Biochem Sci,* **18:** 120; c). Rufino S. D., Blundel T. L. (1994) Structure based identification and clustering of protein families and superfamilies. *J Comput-Aided Mol Desing,* **8**:5.

3. Chou P. Y., Fasman G. D. (1973) Secondary structure tendencies of aminoacid residues. *J Mol Biol,* **74:**263.

4. Minor Jr D. L., Kim P. S. (1996) Context dependent secondary structure formation of a designed protein sequence. *Nature,* **380:** 730.

5. a) Woodward C. (1993) Is the slow exchange core the protein folding core? *Trends Biochem Sci,* **18**:359; b). Dobson C. M., Evans P. A., Radford S. E. (1994) Understanding how proteins fold: the lysozyme story so far. *Trends Biochem Sci,* **19**:31.

6. a). Hartl F. V., Hlodem R., Langer T. (1994) Molecular chaperons in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem Sci,* **19:**20; b). Schmidt D., Baici A., Gehring H., Christensen P., (1994) Kinetics of molecular chaperone action. *Science,* **263:**971; c). Bergeren J. J. M., Brenner M. B., Thomas D. Y., Williams D. B., (1994) Calnexin, a membrane bound chaperone of the endoplasmatic reticulum. *Trends Biochem Sci,* **19:**124.

Scanned with OKEN Scanner

METODE MODERNE DE DETERMINARE A STRUCTURII PRIMARE A PROTEINELOR. ELECTROFOREZĂ BIDIMENSIONALĂ ŞI SPECTROMETRIE DE MASĂ

S. POPA

Determinarea secvenţei de aminoacizi a proteinelor separate prin electroforeză bidimensională în gel de poliacrilamidă

Electroforeza bidimensională în gel de poliacrilamidă, cuplată cu tehnici de microsecvenţare şi stabilirea de baze de date de proteine, s-a dovedit a fi o strategie puternică şi sensibilă pentru detectarea, purificarea şi identificarea proteinelor individuale dintr-un amestec complex de proteine celulare. Aplicarea acestei strategii este esenţială şi, în acelaşi timp, complementară eforturilor îndreptate spre cartarea şi secvenţarea întregului genom uman[1]. Ca tehnică analitică de separare, electroforeza bidimensională în gel de poliacrilamidă este inegalabilă în ceea ce priveşte posibilitatea de a rezolva simultan sute de proteine din extracte celulare. Deoarece electroforeza bidimensională presupune separarea în prima dimensiune prin focalizarea izoelectrică, iar în a doua dimensiune o separare în prezenţă de dodecil sulfat de sodiu, deci strict în funcţie de masă moleculară, ea dă informaţii asupra pH-ului izoelectric, a masei moleculare şi abundenţei relative a proteinelor [2]. Beneficiind de progresele realizate în analiza gelurilor asistată de calculator, s-au creat baze de date a proteinelor care constau din cataloage care conţin proteinele care caracterizează un anumit tip de celulă sau ţesut.

Tehnicile tradiţionale de secvenţare pentru identificarea proteinelor separate prin electroforeză bidimensională, cum ar fi degradarea Edman, sunt limitate deoarece 80–90% din proteinele mamiferelor au capătul amino blocat. Deşi scindarea proteinelor, urmată de extracţie şi separarea fragmentelor prin HPLC, permite secvenţarea fragmentelor interne prin metoda Edman [3], această tehnică singură nu este suficient de rapidă pentru identificarea miilor de proteine dintr-un lizat celular.

Scanned with OKEN Scanner

Datorită vitezei, a sensibilității și a abilității de a lucra direct cu amestecuri de peptide, metodele moderne de secvențare cu ajutorul spectrometriei de masă sunt cele mai indicate pentru identificarea proteinelor separate prin electroforeză bidimensională. Dintre acestea, spectrometria de masă în tandem este ideală pentru analiza proteinelor izolate prin electroforeză bidimensională datorită sensibilității și vitezei mari cu care se pot obține numeroase date de secvență. Spectrometria de masă în tandem este singura metodă capabilă să determine secvența peptidelor cu capătul amino blocat și a peptidelor modificate covalent, dând, în același timp, și informații asupra structurii acestor modificări.

Strategia adoptată pentru identificarea și caracterizarea proteinelor separate prin electroforeză bidimensională poate fi redată sub forma unei scheme bloc (vezi figura 1) [4]:

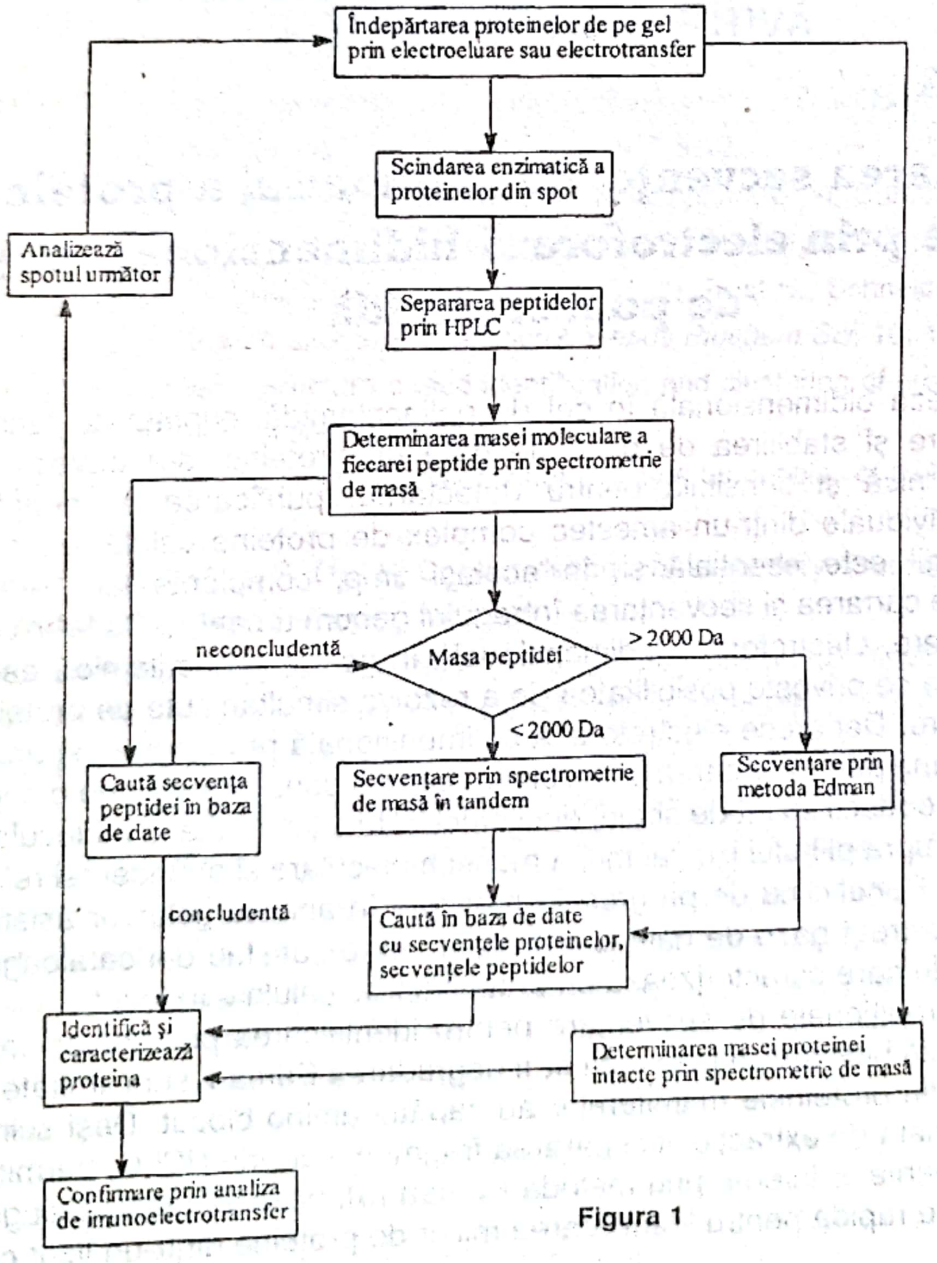


Figura 1

Scanned with OKEN Scanner

Determinarea secvenţei de aminoacizi cu ajutorul spectrometriei de masă în tandem [5,6,7]

În anii '80 s-au pus la punct metode care să permită ionizarea moleculelor mari şi polare, în spectrometre de masă. Noile tehnici de ionizare sunt: FAB (Fast Atom Bombardment), PDI (Plasma Desorption Ionization), MALDI (Matrix–Assisted Laser Desorption Ionization) şi ESI (Electrospray Ionization). Cu ajutorul acestor tehnici se poate determina masa moleculară a unei peptide sau proteine cu o acurateţe de 1: 10^4. Cunoscând masa moleculară cu o precizie atât de mare, se pot rezolva o serie de probleme numai din datele de masă moleculară, şi anume: se poate verifica corectitudinea secvenţei de aminoacizi, se pot detecta mutaţii naturale sau biosintetice, se pot identifica modificări chimice, se poate determina gradul de glicozilare al proteinei, se pot localiza punţile disulfidice şi se pot identifica complexele proteice legate necovalent.

Pentru a obţine informaţii structurale, în speţă secvenţa de aminoacizi, molecula care urmează a fi studiată trebuie fragmentată astfel încât să formeze ioni a căror raport m/z să poată fi legat de structura moleculei. Utilizând tehnica FAB se obţin ioni de tipul $(M + H)^+$ care pot fi analizaţi pentru a li se determina masa moleculară. Aceşti ioni, însă, nu conţin suficientă energie pentru a se produce fragmentarea lor. Pentru aceasta, ionul $(M + H)^+$, care părăseşte primul spectrometrul de masă, este dirijat într-o celulă de coliziune în care se găseşte un gaz inert (He, Ar sau Xe) la o presiune de aproximativ 10^{-3} torr. În urma ciocnirii cu un atom, ionul $(M + H)^+$ (numit ion precursor) este fragmentat într-o proporţie considerabilă, fragmentele rezultate fiind analizate în al doilea spectrometru de masă. Întregul sistem poartă denumirea de spectrometru de masă în tandem (MS/MS). Schematic, procesul se poate reprezenta după cum urmează (vezi figura 2):

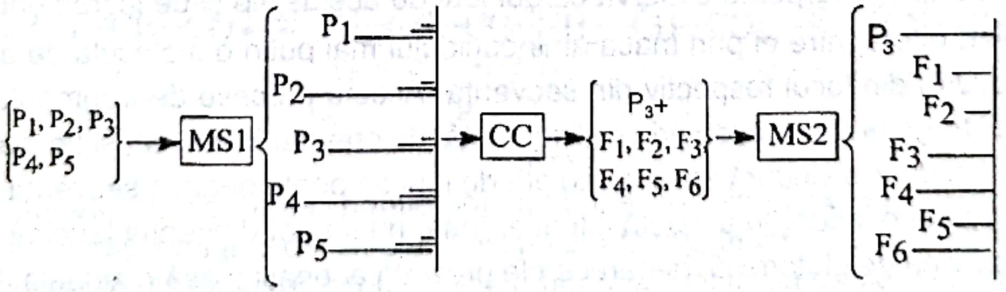


Figura 2

Un amestec de peptide $P_1 \div P_5$ este introdus în spectrometrul de masă MS1. Acesta produce un spectru indicând grupele de izotopi ale celor cinci ioni de tipul $(M + H)^+$. MS1 este apoi fixat pe izotopul ^{12}C al peptidei care prezintă interes, astfel încât fluxul de ioni corespunzători este trecut în celula de coliziune (CC). Fragmentele

Scanned with OKEN Scanner

$F_1 \div F_6$ obţinute în urma fragmentării induse prin coliziune împreună cu o parte din peptida rămasă întreagă (P_3) sunt analizate apoi în spectrometrul de masă MS2. Deoarece înregistrarea spectrului durează 1–2 minute, mai departe MS1 poate fi fixat pe izotopul ^{12}C al altei peptide care urmează acelaşi traseu. Pe măsură însă ce proba este continuu ionizată, ionii $(M + H)^+$ ai peptidelor care nu au fost analizate se pierd. De aceea este bine ca amestecul iniţial să fie simplu (maximum 5 ioni precursori).

Pentru a putea interpreta corect secvenţa de aminoacizi a unei peptide pe baza spectrului de masă dat de MS2, trebuie să se cunoască procesele de fragmentare ale peptidei protonate. În urma fragmentării induse prin coliziune, se pot produce ruperi ale legăturilor din catena de bază după cum urmează (vezi figura 3):

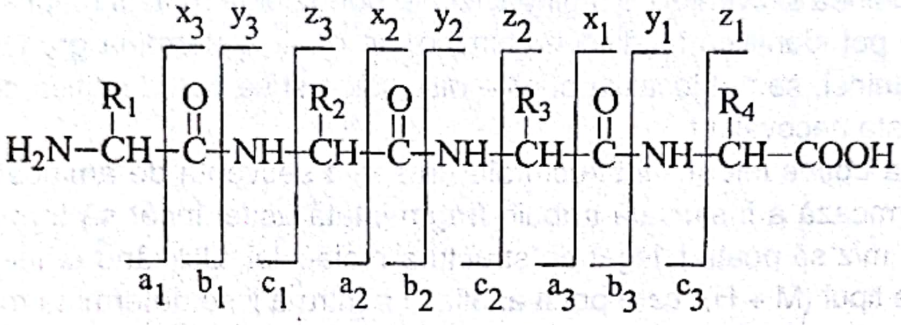


Figura 3

Se pot forma ioni de tipul a_n, b_n, c_n dacă sarcina este reţinută pe fragmentul N-terminal. Excepţie face ionul de tip c_n la care se adaugă 2 Da, deoarece acesta reţine pe lângă hidrogenul protonant încă un atom de hidrogen din cealaltă parte a peptidei. Dacă sarcina este reţinută pe fragmentul C-terminal se formează ioni de tipul x_n, y_n, z_n, pentru ionii de tip y_n se adaugă 2 Da din aceleaşi motive expuse pentru ionii de tip c_n. Se poate observa că doi ioni de acelaşi tip şi de increment n, respectiv n+1, diferă între ei prin masa aminoacidului mai puţin o moleculă de apă (masă reziduală) din locul respectiv din secvenţă. Aceste procese de fragmentare apar în cazul fragmentării induse prin coliziune atât de energie înaltă, cât şi de joasă energie. Astfel, dintr-o singură serie completă de ioni se poate deduce secvenţa de aminoacizi a unei peptide. În această situaţie, însă, nu se pot diferenţia leucina de izoleucină şi lizina de glutamină, deoarece ele prezintă aceeaşi masă reziduală. De obicei, însă, nu se observă o singură serie de ioni, ci fragmente N- şi C-terminale care se suprapun, fiind utilizate pentru elucidarea corectă a secvenţei. În cazul fragmentării induse prin coliziune de energie înaltă, pe lângă ruperea legăturilor din catena de bază au loc şi ruperi de legături la catena laterală, rezultând ioni de tipul (vezi figura 4):

Scanned with OKEN Scanner

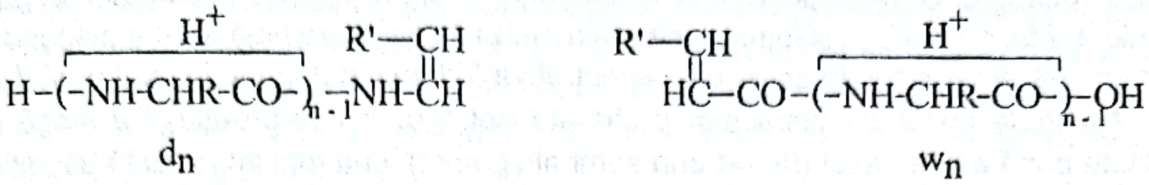


Figura 4

După cum se observă din structura ionilor de tipul d_n și w_n, în cazul leucinei și izoleucinei apare o diferență de 14 Da, deci cei doi aminoacizi pot fi diferențiați dacă apare în spectru cel puțin un astfel de ion. Ruperea legăturilor din catena laterală necesită prezența unei legături β, γ ușor de scindat și de aceea nu apare în cazul glicinei, aminoacizilor aromatici și alaninei (pierderea de hidrogen, aparent, nu este favorizată).

Atât în cazul fragmentării induse prin coliziune de energie înaltă, cât și de joasă energie, se mai observă apariția unor ioni care au pierdut fragmente atât de la capătul C-terminal, cât și de la capătul N-terminal. Aceștia sunt de forma:

$H_2N^+ = CHR$ — ion imoniu

$H_2N - CHR - CO - NH - CHR - C \equiv O^+$ — ion acil de tip fragment intern

Nici unul din cei doi ioni nu dă informații referitoare la secvență, dar ionul imoniu poate fi folosit pentru a identifica unii aminoacizi prezenți în peptidă.

În cazul peptidelor formate numai din aminoacizi neutri, cel mai bazic centru în aceste molecule este atomul de azot din legătura peptidică, care va fi cel care reține protonul. În orice ion $(M + H)^+$ care se ciocnește cu un atom de He există un atom de azot amidic protonat care poate să producă fragmentarea în două moduri (vezi figura 5):

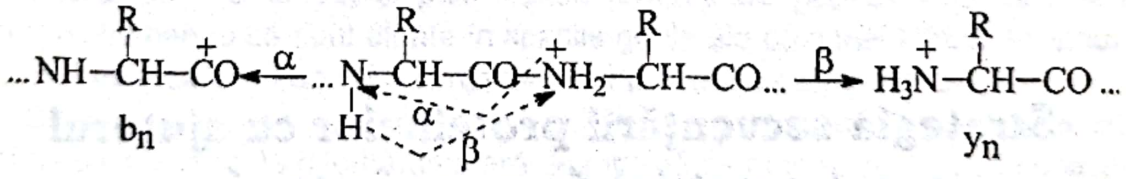


Figura 5

Din păcate, majoritatea peptidelor întâlnite în hidrolizatele enzimatice ale proteinelor nu sunt atât de simple. Deși prezența grupărilor –COOH, –OH, –SH sau -S- nu alterează calea de protonare a grupării amidice, grupările mult mai bazice, ε-NH_2 a lizinei și guanidino a argininei se protonează predominant, având un efect profund asupra formei spectrului. În cazul în care peptida are un rest de lizină la capătul C-terminal, acesta intră în competiție cu gruparea amidică pentru acceptarea protonului la formarea ionului $(M + H)^+$. Reținerea sarcinii pe fragmentele C-terminale este astfel favorizată și ionii y_n vor fi pronunțați și vor da o serie completă. Mai mult, vor apărea și ioni de tip w_n care sunt tot ioni C-terminali.

Scanned with OKEN Scanner

Dacă la capătul C-terminal lizina este înlocuită cu arginină, efectul este şi mai puternic. La fel se pune problema dacă aminoacizii lizină şi arginină sunt aminoacizii N-terminali ai peptidei. În acest caz, spectrul va fi dominat de ioni de tipul a_n şi d_n.

Nu toate spectrele peptidelor protonate pot fi uşor interpretate. Pe lângă o calitate bună a spectrului (raport bun semnal/zgomot), cea mai importantă condiţie este prezenţa a cel puţin unei serii complete de ioni rezultaţi prin fragmentarea catenei de bază, sau cel puţin serii de ioni care se suprapun. Peptidele cu aminoacizi bazici (Lys şi Arg) la capătul C- sau N-terminal, sau cele fără aminoacizi bazici dau spectre simple, uşor de interpretat. Problemele apar dacă aminoacizii bazici sunt în interiorul secvenţei, pentru că aceştia pot duce la formarea numai a ionilor C-terminali, prin scindarea catenei de bază de la capătul N-terminal până la aminoacidul bazic, sau invers, ioni N-terminali de la capătul C-terminal până la aminoacidul bazic. Totuşi, şi în acest caz, spectrul poate fi interpretat, dar pentru confirmare este necesară o scindare enzimatică a peptidei – sau a amestecului în care apare – cu tripsină. Aceasta generează două peptide mai mici, una cu aminoacidul bazic la capătul C-terminal, iar alta fără aminoacizi bazici. O altă modalitate de a obţine confirmarea, în cazul în care aminoacidul bazic este lizina, constă în eliminarea caracterului bazic al grupei ε-NH_2 prin acetilare. Deşi aceasta duce la o creştere a masei moleculare, spectrul se simplifică, devenind tipic peptidelor care nu conţin aminoacizi bazici.

Diferenţierea lizinei de glutamină se poate face în două moduri. Proteina luată în studiu poate fi scindată enzimatic cu tripsină, caz în care lizina va fi aminoacidul C-terminal al peptidelor rezultate. Tripsina, însă, nu poate scinda legătura peptidică Lys-Pro. În acest caz, se realizează o acetilare cu anhidridă acetică, când pe lângă gruparea NH_2 terminală este acetilată şi gruparea ε-NH_2 a lizinei, ceea ce duce la creşterea masei reziduale cu 42 Da.

Strategia secvenţării proteinelor cu ajutorul spectrometriei de masă în tandem

Primul pas îl reprezintă scindarea enzimatică a proteinei după o prealabilă reducere şi alchilare a punţilor disulfidice. Amestecul de peptide rezultat este apoi separat parţial prin HPLC din anumite motive, şi anume: (1) se îndepărtează astfel sărurile din amestecul tampon şi resturile de enzimă; sărurile pot interfera în cazul ionizării FAB; (2) se simplifică amestecul de peptide şi se evită astfel pierderile de peptide care sunt ionizate continuu în timp ce se selectează rând pe rând ionii $(M + H)^+$ în MS1 şi se analizează în MS2. Un număr de 3 peptide/fracţie HPLC este optim, această condiţie putând fi îndeplinită printr-un program standard al

Scanned with OKEN Scanner

solvenţilor fără să necesite optimizări ale procesului; (3) se evită prezenţa simultană a peptidelor hidrofobe în fracţiunea de analizat. Se elimină astfel problema scăderii ionizării peptidelor hidrofobe în prezenţa peptidelor hidrofile.

Această strategie a secvenţării proteinelor este prezentată în următoarea schemă (vezi figura 6).

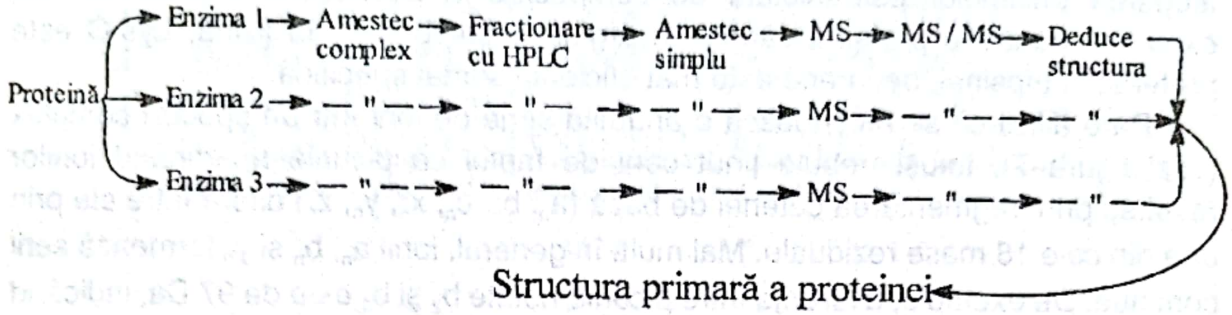


Figura 6

Multe din spectrele rezultate din fragmentare indusă prin coliziune pot fi interpretate uşor şi se poate deduce secvenţa de aminoacizi. Altele însă prezintă o serie de ambiguităţi:

1. uneori, legătura peptidică dintre cei doi aminoacizi N-terminali sau C-terminali nu este fragmentată şi, astfel, nu se poate preciza ordinea lor, sau pot exista mai multe perechi de aminoacizi cu aceeaşi masă reziduală;
2. dacă nu apar ioni d_n sau w_n corespunzători, nu poate fi făcută diferenţierea între leucină şi izoleucină;
3. chiar şi în peptidele triptice, diferenţierea lizinei de glutamină nu se poate baza doar pe specificitatea enzimei.

Există, de asemenea, şi posibilitatea formării de peptide mici care scapă detecţiei, fie pentru că sunt eluate în spaţiile goale ale coloanei HPLC, fie ionul lor $(M + H)^+$ este acoperit de abundenţa picurilor provenite de la matrice.

Din aceste cauze este necesară scindarea enzimatică cu cel puţin două enzime cu specificitate diferită. În afară de tripsină se mai alege cel puţin o enzimă cu o specificitate mare pentru câţiva aminoacizi diferiţi de Arg şi Lys, pentru a genera un nou amestec de peptide total diferite de primul. Există o posibilitate mare ca informaţiile care nu pot fi obţinute din primul amestec de peptide să fie conţinute în noul set. Dacă se utilizează endopeptidaza Glu-C, la valori mici ale pH-ului, aminoacizii C-terminali ai peptidelor vor fi Glu (cu excepţia aminoacidului C-terminal original al proteinei), noul amestec de peptide nu va mai genera nici una din ambiguităţile amestecului de peptide triptice. De exemplu, oricare ar fi cei doi aminoacizi N- sau C-terminali ai unei peptide triptice, este imposibil să fie acelaşi şi în cazul unei peptide obţinute prin scindare cu endopeptidaza Glu-C. În mod similar, o peptidă triptică mică care a scăpat detecţiei va face parte dintr-un fragment mai

Scanned with OKEN Scanner

mare, generat de endopeptidaza Glu-C şi invers. De asemenea, cel puţin masele moleculare ale peptidelor generate de a doua enzimă sunt necesare pentru a alinia corect peptidele triptice. Sunt şi alte enzime care sunt foarte folositoare în cazuri specifice. Astfel de exemplu, Lys-C nu scindează la Arg, dar scindează legătura Lys-Pro, iar Asp-N scindează la capătul amino al acidului aspartic. De multe ori, alegerea enzimelor este dictată de compoziţia în aminoacizi a proteinei. De exemplu, pentru o proteină săracă în arginină, dar bogată în lizină, Lys-C este preferabilă tripsinei, deoarece este mai eficientă şi mai specifică.

Pare dificil să se recunoască o anumită serie de ioni într-un spectru complex (vezi figura 7), totuşi trebuie ţinut cont de faptul că picurile aparţinând ionilor rezultaţi prin fragmentarea catenei de bază (a_n, b_n, c_n, x_n, y_n, z_n) diferă între ele prin una din cele 18 mase reziduale. Mai mult, în general, ionii a_n, b_n şi y_n formează serii continue. De exemplu, diferenţa între picurile notate b_2 şi b_3 este de 97 Da, indicând Pro în poziţia 3. Picul b_4 este cu 101 Da mai mare, plasând Thr în poziţia 4 ş.a.m.d. Faptul că Ile este în poziţia 2 şi nu Leu este indicat de ionul w_8. Un ion este caracteristic pentru Pro, în cazul nostru y_7^{-2}, care indică Pro la poziţia 7 de la capătul C-terminal. Ionii acil de tip fragment intern PT, PTL, PTLL sunt recunoscuţi o dată ce secvenţa peptidei a fost stabilită şi sprijină interpretarea corectă a spectrului. Picurile notate P, xL şi F sunt ioni imoniu, care indică prezenţa Pro, Leu şi/sau Ile şi a Phe. Interpretarea acestor spectre se poate face manual sau computerizat. Se cunosc două programe pentru interpretarea acestor spectre. Unul dintre ele, PLTSEQ, conectează toate picurile din spectru care diferă printr-una din cele 18 mase reziduale (sau mai multe în cazul în care sunt prezenţi aminoacizi modificaţi) şi le notează cu simbolul de o literă al aminoacidului respectiv. Al doilea tip de program realizează o verificare sistematică a tuturor ionilor care se pot forma pe baza cunoştinţelor aproape complete privind procesul de fragmentare a peptidelor protonate, indusă prin coliziune la energie înaltă. Algoritmul SEQPEP interpretează secvenţa pornind de la aminoacidul C-terminal, care este identificat căutând ionii y_1, a_{m-1} şi b_{m-1} (unde m este numărul de aminoacizi ai peptidei, necunoscut la acel moment), prezişi pentru fiecare din cei 20 aminoacizi (18 valori de masă reziduală). Viteza de rezolvare a secvenţei cu ajutorul programului SEQPEP este de 0,5–4 minute, deci este compatibilă cu viteza cu care se obţin datele spectrometrice.

În interpretarea spectrelor nu trebuie luate în considerare spectrele fiecărei peptide ca atare, ci trebuie ţinut cont de faptul că ele formează împreună o proteină. De aceea, din motive practice, nu trebuie „stors" maximum de informaţie dintr-o singură peptidă (ceea ce ar lua mult timp), ci trebuie luate în considerare toate datele împreună. După cum s-a arătat, ambiguităţile dintr-un spectru pot fi rezolvate elegant din spectrul altei peptide (obţinută prin scindarea cu o altă enzimă).

În următoarea figură este prezentat un spectru de masă de energie înaltă obţinut prin fragmentarea indusă prin coliziune, al nonapeptidei GIPTLLLFK [7]:

Scanned with OKEN Scanner

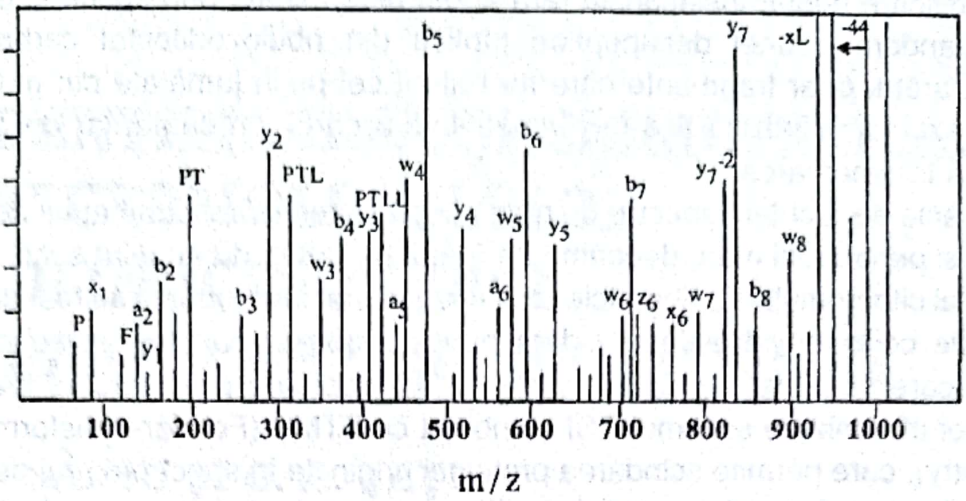


Figura 7

Modificări post-translaţionale

Catenele polipeptidice produse de-a lungul mRNA în ribozom sunt, rareori, funcţionale ca atare şi suferă o serie de modificări structurale imediat după biosinteză sau mai târziu. Aceste modificări nu pot fi deduse din DNA-ul genei care codifică această proteină. Deseori, secvenţa lor nu poate fi determinată prin degradare Edman, fie pentru că au capătul amino blocat, fie pentru că aminoacizii modificaţi îşi pierd grupările modificatoare în condiţiile degradării Edman sau sunt prea hidrofile pentru a putea fi extrase şi cromatografiate cu succes după eliberarea sub formă de derivaţi ai feniltiohidantoinelor (cum ar fi în cazul aminoacizilor glicozilaţi). În aceste cazuri, spectrometria de masă este metoda care permite identificarea directă a acestor modificări. Dintre acestea, N-glicozilarea poate fi determinată din spectrul de masă al ionului precursor dacă se cunoaşte DNA-ul care îl codifică. În proteinele N-glicozilate restul glucidic se leagă de asparagină, dar numai în cazul în care există secvenţa Asn-X-Y unde Y = Ser, Thr şi X = oricare aminoacid. Pentru determinarea O-glicozilării, spectrometria de masă în tandem determină locul de legare a restului glucidic dacă peptida conţine mai multe resturi de Ser sau Thr.

Fosforilarea Ser şi Thr este o altă modificare importantă a proteinelor, a căror activitate biologică este de multe ori reglată de această modificare structurală. Uneori, este posibilă determinarea locului de legare a restului fosfat prin alegerea judicioasă a enzimei proteolitice, care să producă peptide cu o singură Ser sau Thr, a căror masă moleculară indică dacă peptida fosforilată este sau nu cu 80 Da mai grea decât peptida nativă.

Scanned with OKEN Scanner

O modificare post-translaţională rară a fost determinată prin spectrometria de masă în tandem a unei decapeptide triptice din ribulozodifosfat carboxilaza. Spectrul a arătat doar fragmente care au reţinut cel puţin jumătate din moleculă, datorită prezenţei în poziţia 6 a ε-N-trimetil-Lys a cărui ion cuaternar de amoniu controlează fragmentarea.

Încercările de a obţine spectre de masă după sistemul spectrometriei de masă în tandem şi pentru ioni mari, deocamdată (până în 1989), nu au avut succes. Ionii moleculari ai citocromului C, ribonucleazei, mioglobinei şi albuminei au fost disociaţi în celule de coliziune, dar deocamdată nu s-au obţinut cantităţi apreciabile de fragmente care să permită măsurarea lor [8]. O încercare promiţătoare s-a făcut utilizând pentru ionizare sistemul ESI combinat cu FTMS (Fourier-transform mass spectrometry), care permite scindarea proteinei originale în spectrometrul de masă [9, 10]. Se formează astfel perechi de ioni, suma maselor lor corespunzând masei precursorului. Din fiecare fragment se produce apoi câte o pereche de ioni, procesul continuând până când fragmentele sunt suficient de mici pentru a da informaţii privitoare la secvenţă. Ordonarea, apoi, a diferitelor părţi duce la reconstituirea moleculei originale.

Deocamdată, secvenţa proteinelor izolate prin electroforeză bidimensională se determină combinând spectrometria de masă în tandem cu degradarea Edman [4, 11].

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Celis J. E., FEBS Lett., 244, p. 247–254, (1989)

2. Garrels J. I., J. Biol. Chem., 254, p. 7961–7977, (1979)

3. Aebersold R. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, p. 6970–6974, (1987)

4. Clauser R. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, p. 5072–5076, (1995)

5. Gibson R. H., Cohen P., Methods Enzymol., 193, p. 490–501, (1990)

6. Biemann K., Methods Enzymol., 193, 455–479, (1990)

7. Biemann K., Annu. Rev. Biochem., 61, p. 977–1010, (1992)

8. Henry K. D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, p. 9075–9078, (1989)

9. Lebrilla C. B., J. Amer. Chem. Soc., 111, p. 8593–8598, (1989)

10. Loo J. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, p. 286–289, (1992)

11. Hall Steven C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, p. 1927–1931, (1993)

Scanned with OKEN Scanner

IDENTIFICAREA ŞI CARACTERIZAREA MACROMOLECULELOR POLINUCLEOTIDICE. TEHNICI DE DNA RECOMBINAT

O. SÂRBU ŞI C. A. ŢAŢU

Înţelegem prin DNA recombinat o moleculă de DNA formată prin legarea unor fragmente provenite din molecule diferite, proces ce se poate realiza spontan sau ca urmare a unor manipulări genetice.

Tehnologia DNA recombinat se bazează pe:

– utilizarea endonucleazelor restrictive (enzime de restricţie);

– complementaritatea aranjării celor două lanţuri de DNA monocatenar, complementaritate determinată de specificitatea legării pereche a bazelor purinice şi pirimidinice (A întotdeauna legată de T, C întotdeauna legată de G).

Tehnologia DNA recombinat cuprinde tehnici dezvoltate în ultimii 30 de ani [1]:

A) tehnici de clivare şi excizie a unor fragmente specifice de DNA (Arber, 1962);

B) tehnici de secvenţializare a fragmentelor de acizi nucleici (Sanger & Barrell şi Maxam & Gilbert, 1975–1977);

C) tehnici de hibridizare a acizilor nucleici;

D) tehnici de clonare a DNA (Boyer, Coher & Berg, 1972);

E) tehnici de inginerie genetică.

A) Fragmentarea DNA se poate face prin metode fizice, chimice sau enzimatice (cu ajutorul exo- sau endonucleazelor).

Endonucleazele restrictive (sau enzimele de restricţie) au fost izolate din bacterii (Nathan & Smith, 1975), unde au rolul de a le proteja faţă de virusuri sau bacteriofagi. Au proprietatea de a recunoaşte secvenţe specifice de 4–8 nucleotide, numite situsuri de restricţie, şi de a tăia/cliva lanţul bicatenar de DNA la nivelul acestor situsuri, generând fragmente de DNA de dimensiuni bine definite.

De menţionat că se cunosc şi endonucleaze ce acţionează asupra moleculei de DNA monocatenar şi lasă intact DNA-ul bicatenar.

Se cunosc în prezent peste 500 de enzime de restricţie cu situsurile de restricţie corespunzătoare.

Scanned with OKEN Scanner

EcoRI	Escherichia Coli	5'-G↓AATTC-3' 3'-CTTAA↑G-5'
BamHI	Bacillus amyloliquifaciens	5'-G↓GATCC-3' 3'-CCTAG↑G-5'
HpaI	Haemophilus parainfluezae	5'-GTT↓AAC-3' 3'-CAA↑TTG-3'
SmaI	Serratia marcescens	5'-CCC↓GGG-3' 3'-GGG↑CCC-5'

Toate situsurile de restricţie prezintă un centru/ax de simetrie: secvenţa oligonucleotidică (în direcţie 5'–3') de pe un lanţ este identică secvenţei lanţului complementar (citit în aceeaşi direcţie 5'–3'). Funcţie de axa de simetrie a situsului de restricţie, clivarea moleculei de DNA bicatenar poate avea loc:

– în centrul axei de simetrie (HpaI, SmaI etc.) cu formarea de fragmente de restricţie cu capete netede, bicatenare (blunt-ends);

– la capetele opuse ale situsurilor de restricţie (EcoRI, BamHI etc.) cu formarea de fragmente de restricţie cu capete coezive, monocatenare (cohesive ends).

Rezultatul acţiunii unei endonucleaze restrictive asupra unei molecule de DNA este formarea unui amestec de fragmente de DNA bicatenar cu dimensiuni specifice.

Migrarea în câmp electric a amestecului de fragmente de restricţie reprezintă un mijloc eficace de separare (viteza de migrare este invers proporţională cu dimensiunea fragmentelor) şi de determinare a dimensiunilor fragmentelor (prin compararea cu migrarea concomitentă în câmp electric a unui fragment de mărime cunoscută). Acurateţea separării şi analizei este determinată de condiţiile de electroforeză (mediu de migrare, tipul şi intensitatea câmpului electric):

– electroforeza în gel de poliacrilamidă permite separarea unor fragmente de DNA cu dimensiuni < 500 bp, chiar dacă acestea diferă printr-o singură pereche de baze;

– electroforeza în gel de agaroză permite separarea moleculelor de DNA cu dimensiuni cuprinse între 300 şi 10 000 bp;

– electroforeza în gel de agaroză sub un câmp electric pulsator permite separarea moleculelor de DNA foarte mari, cu dimensiuni până la 10^8 bp.

Problema vizualizării benzilor de DNA este rezolvată prin marcarea moleculelor de DNA fie chimic (de exemplu cu bromură de etidiu), fie radioactiv (^{32}P, ^{35}S).

B) Secvenţializarea reprezintă procesul de identificare a succesiunii bazelor nucleotidice dintr-o moleculă de DNA sau RNA.

Scanned with OKEN Scanner

Prima secvenţializare reuşită a fost efectuată de R. W. Holley & co. în 1965, pe alanin-tRNA din drojdie. Procedeul folosit avea la bază hidroliza selectivă a legăturilor internucleotidice cu fragmentarea controlată a moleculei de tRNA. În prezent s-au impus două tipuri de metode de secvenţializare: metoda chimică (Maxam & Gilbert, 1975) şi metoda enzimatică (Sanger & co., 1975).

Secvenţializarea chimică se bazează pe procedee de alterare a bazelor purinice şi pirimidinice, urmată de excizia acestora (depurinare, respectiv depirimidinizare) şi clivarea consecutivă specifică a lanţului polinucleotidic. Procesul se realizează în patru recipiente diferite, în fiecare din ele producându-se clivarea la nivelul bazelor alterate; se obţin patru tipuri de fragmente corespunzătoare secţionării la nivelul A, C, G, respectiv T. Separarea electroforetică ulterioară a fragmentelor de clivaj permite identificarea secvenţei oligonucleotidelor în molecula care ne interesează.

Secvenţializarea enzimatică (metoda dideoxi- sau metoda lanţului terminal) utilizează DNA monocatenar şi un primer care se fixează la un capăt al acestuia. Lanţul de DNA monocatenar ce trebuie citit serveşte ca matriţă pentru sinteza *in vitro* de noi secvenţe de DNA complementar (vezi figura 1).

Procesul decurge în prezenţa DNA-polimerazei I şi al unui amestec de dideoxiribonucleozidtrifosfaţi (ddATP, ddGTP, ddCTP şi ddTTP) şi deoxiribonucleozidtrifosfaţi în exces (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Tehnica se execută în patru recipiente, fiecare conţinând câte un tip de dideoxiribonucleozid. Când un nucleotid dideoxi- este încorporat în lanţul complementar, legarea de noi nucleotide este blocată, astfel încât, la finele reacţiei, fiecare recipient conţine un amestec de fragmente de sinteză, de dimensiuni diferite, terminate cu ddATP, ddCTP, ddGTP, respectiv ddTTP. Prin analiza migrării în gel a produşilor din amestecurile de reacţie se poate determina secvenţa bazelor din lanţul matriţă de DNA.

C) Tehnicile de hibridizare a acizilor nucleici se bazează pe două din proprietăţile esenţiale ale acestora:

- denaturarea – ruperea legăturilor dintre bazele complementare cu disocierea rapidă a duplex-ului DNA în două lanţuri monocatenare;
- renaturarea (hibridizarea) – capacitatea lanţurilor monocatenare de a forma/reface helix-ul bicatenar prin legarea de un lanţ monocatenar complementar.

Reacţiile de hibridizare se pot produce între lanţuri de DNA sau RNA cu formarea de hibrizi DNA/DNA, DNA/RNA sau RNA/RNA.

Folosirea tehnicilor de hibridizare în vederea obţinerii de informaţii despre moleculele de DNA sau RNA care ne interesează implică folosirea unei sonde (= moleculă monocatenară de DNA sau RNA, marcată chimic sau radioactiv, complementară total sau parţial moleculei de analizat).

Aplicaţiile tehnicilor de hibridizare sunt atât de variate încât, practic, nu se mai poate imagina analiza structurii şi funcţiei unei molecule fără utilizarea acestora. Specificitatea şi sensibilitatea lor deosebită permit:

Scanned with OKEN Scanner

– determinarea concentraţiei unei molecule de DNA sau RNA dintr-un amestec;
– determinarea prezenţei şi a numărului de copii ale unei secvenţe nucleotidice în genomul unei celule;
– localizarea unei gene clonate;
– identificarea genelor active dintr-un genom;
– analiza structurii unei proteine etc.

Cel mai frecvent, tehnicile de hibridizare se folosesc după separarea electroforetică a unui amestec de acizi nucleici. Gelul de electroforeză nu este, însă, un mediu propice hibridizării (apare hibridizare nespecifică de fond; legarea sondelor este defectuoasă). De aceea, se impune efectuarea transferului (blotting) fragmentelor de acid nucleic de pe benzile de electroforeză pe o membrană de nitroceluloză, care este un mediu de elecţie pentru hibridizare.

Transferul implică punerea în contact a gelului de electroforeză cu membrana de nitroceluloză, întreg ansamblul fiind străbătut de o soluţie tampon în direcţia gel-membrană. După realizarea transferului, membrana de nitroceluloză este incubată cu o soluţie care conţine sonda; se folosesc concentraţii de săruri şi o temperatură astfel încât legăturile formate între sondă şi molecula de acid nucleic să fie stabilizate. O dată transferul încheiat, membrana de nitroceluloză este spălată pentru eliminarea sondei care nu a hibridizat, după care se trece la vizualizarea hibrizilor formaţi.

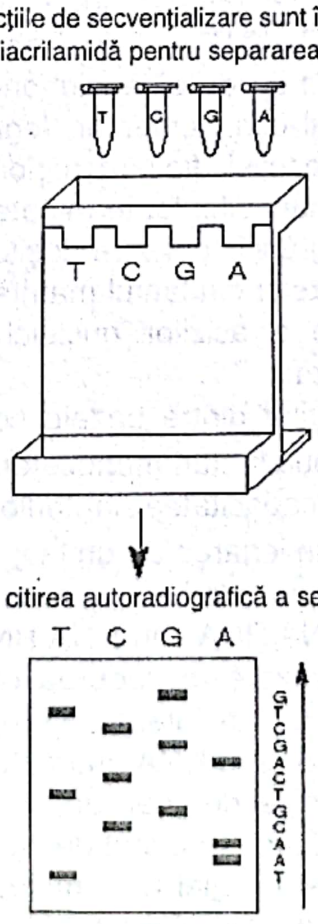


Figura 1

Scanned with OKEN Scanner

Analiza fragmentelor de DNA prin tehnica blotting-ului și a hibridizării a fost pusă la punct de E. M. Southern în anul 1975 și a fost denumită Southern-blott; metoda se folosește și pentru analiza RNA (Northern-blott) și a proteinelor (Western-blott).

Una dintre cele mai spectaculoase aplicații ale tehnicii de hibridizare este diagnosticul prenatal. Se cunosc în prezent peste 3000 de boli genetice cu defect monogenic, cea mai mare parte a acestora având exprimare recesivă; în aceste condiții devine importantă identificarea embrionilor sau fetilor homozigoți pentru gena recesivă.

Principalele indicații ale diagnosticului prenatal sunt [9, 12]:

– vârsta maternă > 35 de ani;
– nașteri anterioare ale unor copii cu tare genetice sau cu defecte de închidere a tubului neural;
– gravidă purtătoare a unei boli cu transmitere X-linkată;
– ambii părinți sunt purtători ai unei/unor boli cu transmitere autosomal recesivă.

Se cunosc la ora actuală trei metode de diagnostic prenatal:

- amniocenteza – puncția cavității amniotice cu recoltarea de lichid amniotic; se practică în săptămâna 15–16 de sarcină;
- puncția vilozităților coriale – se efectuează în săptămânile 8–2 de sarcină și constă în puncția placentară transcervicală cu recoltarea a 10–25 mg de țesut;
- diagnosticul genetic preimplantațional.

Se descriu trei tehnici de diagnostic preimplantațional:

- biopsia globulilor polari (diagnostic preconceptual) presupune recoltarea ovocitelor primare, excizia și analiza genetică a globului polar;
- biopsia trofoectodermului se efectuează pe embrioni în stadiul de blastocist, embrioni obținuți prin lavaj uterin (mai rar și cu eficiență scăzută) sau prin fertilizare *in vitro;*
- biopsia embrionului preimplantațional se aplică, de obicei, pe embrioni în stadiul de 8 celule (blastomere), din care se recoltează, cu ajutorul unui micromanipulator, 1 sau 2 blastomere.

Metodele de analiză genetică cele mai frecvent folosite în diagnosticul prenatal sunt:

- FISH (Fluorescent in situ hybridization) care permite evidențierea moleculelor de RNA din celule și localizarea unor secvențe specifice de DNA la nivelul cromozomilor;
- RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphysms = polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție) utilizează ca markeri genetici secvențe scurte de DNA (fără expresie fenotipică), ce diferă de la individ la individ. Un marker RFLP este cu atât mai util, cu cât este mai frecvent într-o populație, iar probabilitatea de a

Scanned with OKEN Scanner

se transmite de la părinţi la copii este mai mare. Identificarea markerilor RFLP (Southern-blott) cu transmitere linkată cu a genei defective permite calcularea riscului naşterii unui copil cu tara genetică respectivă.

- PCR (Polymerase Chain Reaction = reacţia de polimerizare în lanţ).

D) Termenul de clonare a DNA-ului defineşte procesul de producere a numeroase copii (= amplificare) a unei secvenţe de DNA prin cicluri repetate de replicare.

Se descriu două metode, una *in vivo,* utilizând vectori de clonare, cealaltă *in vitro,* metoda PCR.

Înţelegem prin vector de clonare o moleculă de DNA capabilă de autoreplicare (independent de replicarea cromozomilor celulei gazdă). În practică se utilizează ca şi vectori de clonare:

– plasmide;
– virusuri/bacteriofagul λ;
– cosmide.

Plasmidele sunt cel mai frecvent utilizate ca vectori de clonare; au fost izolate din celule procariote (de ex. Escherichia Coli) şi chiar din celule eucariote (Zea mays). DNA-ul plasmidic este lipsit de histone, are conformaţie de duplex circular şi conţine gene ai căror produşi sunt implicaţi în rezistenţa la antibiotice, fertilizare, oncogeneză etc.

Bacteriofagul λ este parazit la bacteria E. Coli, are un DNA de aproximativ 3×10^7 Da. Poate infecta bacteria gazdă în două moduri:

– un ciclu litic cu multiplicarea intracelulară şi liza consecutivă a celulei, având ca rezultat eliberarea virionilor;
– un ciclu lizogenic, caz în care DNA-ul fagului este integrat în genomul bacteriei gazdă sub formă de profag (proces catalizat de λ integrază); genele profagului sunt blocate de un represor (virus temperat) şi sunt transmise celulelor fiice prin diviziune.

Cosmidele (Collins & Holm) sunt vectori de tip mixt, bacteriofag şi plasmidic, utilizaţi pentru clonarea de fragmente de DNA foarte mari, de până la 45 Kb.

Sunt posibile două abordări ale clonării DNA [1]:

– pornind de la biblioteci de DNA genomic (aşa-numitul „shot-gun approach");
– pornind de la biblioteci de cDNA.

În cazul primei abordări se recurge la tăierea întregului DNA genomic cu o anumită endonuclează restrictivă; se obţine un amestec de reacţie cu sute de mii de fragmente de restricţie. Acestea pot fi separate, purificate şi, apoi, încorporate într-un vector de clonare, astfel proiectat şi construit încât să conţină un singur situs de restricţie pentru endonucleaza folosită la tăierea DNA-ului genomic. Incubarea vectorului de clonare cu enzima de restricţie produce un fragment liniar de DNA cu capete coezive. Prin incubare în prezenţa DNA-ligazei, fragmentele de restricţie pot fi încorporate în vectorul de clonare, rezultând vectori care conţin câte un fragment

Scanned with OKEN Scanner

de DNA exogen (vectori recombinaţi) şi care pot fi introduşi în celulele bacteriene. Un asemenea vector este denumit clonă de DNA genomic, iar colecţia de vectori recombinaţi astfel obţinută, bibliotecă de DNA genomic.

În cel de-al doilea caz, clonarea se face doar cu fragmentele de DNA transcrise în celula de analizat (= exoni). Tehnica porneşte de la mRNA, extras şi purificat din citoplasmă; sub acţiunea revers-transcriptazei (enzimă de origine retrovirală ce sintetizează DNA pornind de la o matriţă de RNA) se obţine un amestec de DNA complementar monocatenar. Incubarea cDNA monocatenar în prezenţa DNA-polimerazei conduce la cDNA bicatenar, care poate fi inserat într-un vector de clonare, formând o clonă de cDNA; întreaga colecţie de clone de cDNA astfel obţinută poartă denumirea de bibliotecă cDNA.

În continuare, etapele clonării DNA sunt identice, fie că pornim de la o bibliotecă de DNA genomic sau o bibliotecă de cDNA:

– transfecţia vectorului de clonare recombinat;
– selectarea coloniilor bacteriene în care s-a produs transfecţia;
– identificarea coloniilor transfectate cu un vector de clonare recombinat;
– identificarea coloniilor bacteriene care conţin fragmentul de DNA care ne interesează.

Termenul de transfecţie defineşte introducerea unei molecule de DNA într-o celulă cu încorporarea sa în genomul celulei ţintă. Procesul are loc în prezenţa cationilor multivalenţi (Ca, Mn, Sr) şi la temperaturi în jurul a 0°C. Eficienţa procesului poate fi îmbunătăţită prin alternarea unor cicluri de congelare-decongelare, precum şi prin adăugarea în mediul de reacţie a unor dizolvanţi organici şi a unor compuşi sulfataţi.

Identificarea coloniilor [5] care conţin vectorul de clonare recombinat se poate face cu ajutorul testelor de rezistenţă la antibiotice. De exemplu, plasmidul pBR322 conţine două gene ale rezistenţei la antibiotice: tc^R, care conferă rezistenţă la tetraciclină, şi Ap^R, care conferă rezistenţă la ampicilină. Plasmidul în cauză poate fi astfel inginerizat încât situsul de restricţie al endonucleazei folosite să se situeze în interiorul genei tc^R. Cultivând bacteriile transfectate cu pBR322 recombinat pe mediu cu ampicilină vom realiza selecţia clonelor care au încorporat plasmidul originar sau recombinat (doar acestea supravieţuiesc). Un screening ulterior, cu cultivare pe mediu cu tetraciclină, identifică acele clone la care transfecţia s-a făcut cu plasmid recombinat (acestea nu supravieţuiesc).

Cea mai importantă etapă din protocolul de clonare a unei gene este identificarea coloniilor ce conţin fragmentul de DNA care ne interesează. Cel mai frecvent folosită este tehnica hibridizării *in situ*. Sonde specifice pot fi sintetizate pornind de la secvenţa în aminoacizi a proteinei produse de gena de analizat. Practic, orice ligand care se leagă de proteina sintetizată de gena care ne interesează poate fi marcată şi folosită ca sondă.

Scanned with OKEN Scanner

Vectorul de clonare recombinat poate fi separat de cromozomii celulei gazdă prin centrifugare; incubarea ulterioară cu aceeași enzimă de restricție folosită în fazele anterioare eliberează insertul AND (fragmentul de DNA exogen).

PCR poate fi definită ca o metodă de amplificare *in vitro* a unei secvențe specifice de DNA. Dispozitivul în care se desfășoară procesul este un termostat (termocycler), în care temperatura variază între 30° și 100°C. Secvența proceselor care au loc în interiorul reactorului este următoarea:

- denaturarea probei de DNA (5 minute la 94°C);
- fixarea primerilor; specificitatea reacției este determinată de temperatura la care reacția decurge (30°–60°C) și de compoziția primerilor;
- sinteza unor noi lanțuri de DNA cu ajutorul DNA-polimerazei (2–5 minute la 65°–75°C).

Aceste reacții se succed de 30 până la 60 de ori. Produși nespecifici apar dacă proba de DNA este în cantitate mare și există posibilitatea de a se autoamplifica. Principiul de bază al metodei este prezentat în figura 2.

Primerul este un fragment de DNA monocatenar cu o secvență oligonucleotidică complementară bazelor de la capetele lanțului de amplificat. Lungimea optimă a unui primer este de 20–24 de nucleotide, lungimea minimă este de 16 nucleotide.

Legarea primerului de unul din capetele moleculei de amplificat poartă denumirea de priming și are rolul de a iniția polimerizarea. Ambele lanțuri ale moleculei de DNA pot servi ca matriță, astfel că vom alege câte un primer pentru fiecare lanț, astfel încât să delimiteze secvența de multiplicat.

DNA polimeraza folosită de obicei (Taq) este extrasă din bacteria *Thermus aquaticus;* condițiile optime de activitate includ un pH cuprins între 8,2 și 9, un tampon Tris 10 mM și o temperatură de 25°C. Enzima este foarte termorezistentă, păstrându-și activitatea și la 90°C.

Cerințele de bază ale reacției PCR sunt:

- secvența de DNA să fie intactă pe lungimea de amplificat;
- denaturarea moleculei de DNA de amplificat să fie completă;
- absența din mediul de reacție a posibililor inhibitori ai sintezei DNA-ului (EDTA, urme de fenoli, detergenți);
- primerii folosiți trebuie să fie similari d.p.d.v. al conținutului de G + C / să prezinte auto-complementaritate minimă / să prezinte complementaritate reciprocă minimă.

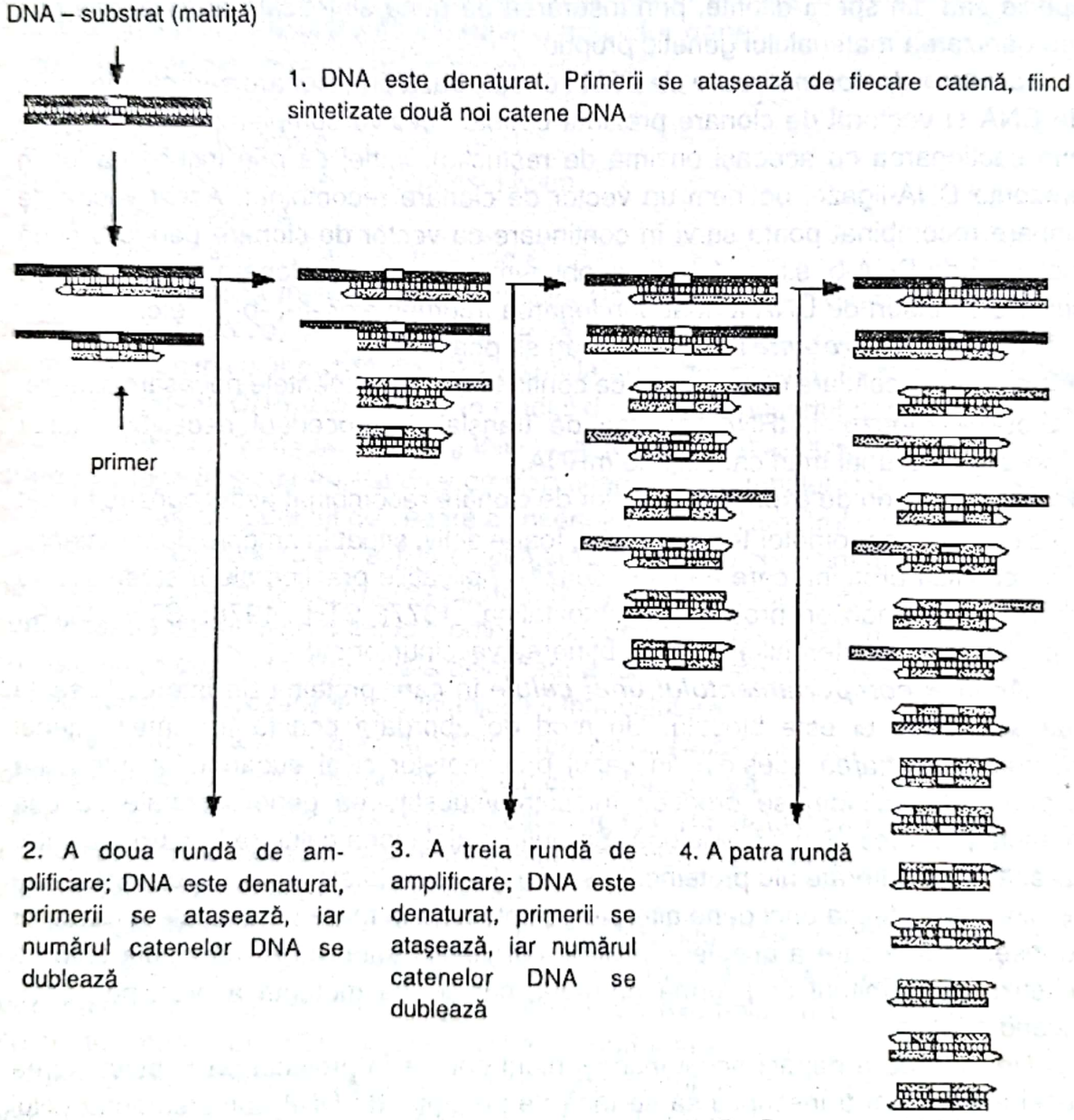
Principalele aplicații ale metodei sunt:

1. Identificarea mutațiilor de orice tip (punctiforme, deleții, inserții etc.) permite diagnosticarea cea mai precisă și rapidă a unor boli ereditare și a cancerului; astfel, cu ajutorul amplificării enzimatice s-au putut analiza tipul și frecvența

Scanned with OKEN Scanner

mutaţiilor oncogenei *ras* în genomul uman, iar pe baza mutaţiilor existente s-a conceput o nouă clasificare a limfoamelor.

2. Monitorizarea terapiei anticanceroase; un exemplu este limfoblastomul folicular caracterizat de translocaţia t (14; 18) (q32; q21). Cu ajutorul primerilor specifici pentru cele două fragmente genice pot fi identificate celulele mutante, astfel că se poate stabili cu exactitate când trebuie/poate fi întreruptă, respectiv reluată o terapie cu citostatice sau prin iradiere.
3. Diagnosticul infecţiilor bacteriene şi virale; rapiditatea, sensibilitatea şi specificitatea reacţiei o impun ca o metodă de prim rang în studiile epidemiologice.



1. DNA este denaturat. Primerii se ataşează de fiecare catenă, fiind sintetizate două noi catene DNA

2. A doua rundă de amplificare; DNA este denaturat, primerii se ataşează, iar numărul catenelor DNA se dublează

3. A treia rundă de amplificare; DNA este denaturat, primerii se ataşează, iar numărul catenelor DNA se dublează

4. A patra rundă

5. Repetarea ciclului de polimerizare produce un număr foarte mare de copii DNA identice care conţin secvenţa genică de interes

Figura 2

Scanned with OKEN Scanner

În cazul studiilor evolutive întâlnim, relativ frecvent, necesitatea analizei unor fragmente genice provenite din resturile unor organisme decedate; s-a putut stabili cu exactitate, pe baza unei singure secvenţe de DNA a unei plante extrasă din straturile de ardezie din miocen (18 milioane de ani), că această plantă face parte din familia magnoliilor.

E) Apariţia tehnicilor de inginerie genetică a revoluţionat studiul genelor, moleculelor RNA şi a proteinelor.

Prin inginerie genetică înţelegem modificarea structurii genetice a unui organism prin introducerea de gene noi aparţinând unor organisme din aceeaşi specie sau din specii diferite, prin inserarea de gene sintetizate artificial sau prin reorganizarea materialului genetic propriu.

Sinteza de noi molecule de DNA se realizează prin clonare seriată. Molecula de DNA şi vectorul de clonare prezintă capete coezive complementare (obţinute prin secţionarea cu aceeaşi enzimă de restricţie), astfel că prin incubarea lor în prezenţa DNA-ligazei obţinem un vector de clonare recombinat. Acest vector de clonare recombinat poate servi în continuare ca vector de clonare pentru o nouă moleculă de DNA-b- ş.a.m.d. În final, obţinem un vector de clonare recombinat, ce conţine un insert de DNA format prin legarea fragmentelor -a-, -b-,... etc.

Sinteza de proteine în cantităţi mari se poate face:

- în sisteme acelulare de translaţie ce conţin toate componentele necesare sintezei proteice (ribozomi, tRNA, enzime de translaţie); procedeul necesită sinteza prealabilă a unei mari cantităţi de mRNA;
- folosind vectori de expresie (= vector de clonare recombinat astfel construit încât să conţină un promotor termosensibil, foarte activ, situat în amonte de fragmentul ce codifică proteina care ne interesează). Aplicaţiile practice ale metodei includ sinteza hormonilor proteici (somatostatina, 1977; STH, 1978; STH, 1979), producerea interferonilor umani, obţinerea vaccinurilor etc.

Analiza comportamentului unei celule în care proteina de interes lipseşte sau activitatea ei este blocată. Un mod de abordare constă în sinteza genei mutante şi clonarea acesteia; în cazul procariotelor şi al eucariotelor inferioare (organisme haploide) se produce înlocuirea/substituirea genei normale cu cea mutantă prin recombinare omologă. Se obţin astfel clone celulare în care se sintetizează forme alterate ale proteinei în studiu. La eucariotele superioare (organisme diploide), transfecţia unei gene alterate se soldează în marea majoritate a cazurilor cu inserţia aleatoare a acesteia în genomul celulei ţintă, astfel că celula ţintă va sintetiza concomitent atât forma normală, cât şi cea mutantă a proteinei, complicând analiza.

Un mod de a depăşi acest inconvenient constă în proiectarea şi asamblarea genei astfel încât transcripţia să se facă de pe lanţul de DNA complementar celui pe care se realizează transcripţia în mod normal. Gena astfel proiectată va produce

Scanned with OKEN Scanner

molecule de RNA antisens cu o secvenţă oligonucleotidică complementară produşilor de transcripţie normali.

Sintetizate în cantităţi mari, moleculele RNA antisens ajung să formeze helixuri bicatenare cu moleculele RNA „sens" normale, blocându-le translaţia.

O metodă asemănătoare foloseşte molecule antisens de acid nucleic sintetizate artificial. Din motive încă neclare, metoda de inactivare a unei gene cu molecule de RNA antisens eşuează pentru unele gene.

***Producerea animalelor transgenice** [6]*

Dintre utilizările tehnicilor de obţinere a şoarecilor transgenici amintim:
– studiul specificităţii tisulare de expresie a anumitor gene;
– studiul hormonilor şi receptorilor hormonali;
– studiul oncogenelor;
– studiul controlului expresiei unor gene;
– studiul genelor implicate în răspunsul imun;
– teste de mutageneză;
– producerea industrială a unor proteine etc.

Cea mai folosită metodă implică injecţia DNA-ului exogen direct în pronucleii zigotului de şoarece; metoda conduce la o integrare stabilă a insertului în cromozomii animalului gazdă (în 10% până la 40% din cazuri). În cele mai multe cazuri, integrarea DNA-ului se face în stadiul de o celulă (insertul genomic poate fi pus în evidenţă în toate celulele organismului adult). În 20%–30% din cazuri, integrarea se face în stadii mai tardive de dezvoltare a embrionului (organismul adult este un mozaic din punctul de vedere al insertului genic). Numărul de copii de DNA exogen inserate variază de la 1 la câteva sute şi nu este condiţionat de cantitatea de DNA injectată în zigot. În general, în cazul prezenţei mai multor copii, acestea sunt inserate într-un singur locus cromozomial, deşi eventualitatea inserţiei multiple nu este chiar o raritate. Principala dificultate a tehnicii este reprezentată de tehnicitatea ridicată, necesară efectuării injecţiei intracelulare.

O altă metodă face apel la vectori retrovirali (wild-type sau recombinaţi) şi foloseşte embrioni pre- sau postimplantaţionali; integrarea insertului de DNA este de tip cromozomial, stabilă. Tehnica nu este larg folosită, datorită apariţiei frecvente a fenomenelor de mozaicism, a problemelor legate de expresia genelor transferate şi de obţinerea unor titruri mari de vectori.

Animale transgenice pot fi obţinute folosind celule stem embrionare (ES). Transfecţia celulelor stem embrionare se poate face prin electroporare, infecţie retrovirală sau lipofecţie. Procedeul se aplică, de exemplu, în studiul genelor cu efecte dominante letale în cursul dezvoltării embrionare.

Introducerea de material genetic nou în embrionul de şoarece se poate face şi prin transplantarea nucleară; metoda nu permite însă introducerea unor gene clonate sau a unor mutaţii. Tehnica a fost folosită pentru studiul totipotenţei nucleilor

Scanned with OKEN Scanner

embrionilor tineri, al rolului genomului matern sau/şi patern în dezvoltarea embrionară etc.

Lungimea insertului de DNA depinde de tipul de vector folosit şi, evident, de gena de transfectat; fragmente de 50 kb (bacteriofagul lambda), 60 de kb (utilizând cosmide) sau chiar 70 kb (prin legarea *in vitro* a doi inserţi cosmidici). Secvenţe mai mari pot fi construite *in vivo* prin injecţia concomitentă a două sau mai multe fragmente de DNA, între care se realizează recombinare omoloagă înaintea sau în timpul inserţiei în cromozomii celulei gazdă. Recent, au fost transfectate fragmente de sute de kb folosind „cromozomii artificiali" de drojdie.

Se presupune că responsabile de inhibiţia expresiei genelor inserate în genomul celulei gazdă sunt anumite secvenţe din DNA-ul vectorului (fără a fi cunoscut dacă aceasta este o proprietate generală sau doar a unor secvenţe din genomul procariotelor). Este de înţeles, în aceste condiţii, de ce este imperios necesar ca doar DNA-ul eucariot să fie inserat în cromozomii celulei gazdă. Se cunosc în prezent mai mulţi vectori de clonare care conţin situsuri de clonare mărginite de situsuri de restricţie ale enzimei *NotI* (care excizează doar DNA-ul eucariot) sau ale enzimei *BssHII* (foarte rară la eucariote).

Factorii care afectează eficienţa transferului genic sunt încă insuficient studiaţi.

Nu există dovezi ale influenţei compoziţiei în baze a lanţului de inserat; în plus, exceptând dificultăţile de izolare şi construcţie a unor fragmente mari de DNA, nu există limitări ale metodei legate de mărimea insertului genic. Eficienţa transferului genic este influenţată de:

1) puritatea DNA-ului folosit; sunt de evitat urmele de fenol, etanol, enzime sau orice tip de material particular care ar putea înfunda pipeta de injecţie;

2) mediul tampon folosit; în mod obişnuit, acesta conţine 5–10 mM Tris (pH 7,4) şi 0,1–0,25 mM EDTA în apă distilată; schimbarea acestor parametri modifică atât supravieţuirea celulelor/embrionilor sau scade drastic eficienţa integrării;

3) concentraţia DNA-ului; este practic imposibil de controlat cu acurateţe volumul soluţiei de DNA injectat în pronucleu; se estimează că aprox. 1–2 pl de soluţie sunt introduşi, dar nu este cunoscut procentul de DNA care rămâne în nucleu. Singurul parametru care poate fi controlat este concentraţia de DNA din soluţia de injectat; concentraţia optimă este situată în jurul valorii de 1µg/ml (corespunzând valorii de 200–400 de fragmente de 5 kb/pl), care dă valori ale integrării de 10%–40%. Nu este cunoscută, din păcate, corelaţia dintre concentraţia DNA-ului injectat şi numărul de copii integrate;

4) forma circulară sau lineară a DNA-ului; se pare că folosirea de DNA linear conduce la rate ale integrării semnificativ mai mari decât în cazul folosirii DNA-ului circular.

Scanned with OKEN Scanner

Gene knock-out

Transferul unei gene wild-type sau mutante într-o celulă eucariotă se soldează cu inserţia aleatoare a genei într-unul din cromozomii celulei gazdă, astfel că există o şansă de 1:1000 ca gena mutantă să înlocuiască una din cele două copii ale genei normale (prin recombinare omoloagă). Fenomenul poate fi folosit pentru a produce linii de animale la care activitatea unei gene lipseşte cu desăvârşire.

Într-o primă etapă, fragmentul de DNA conţinând gena mutantă este inserat într-un vector de clonare, cu transfecţia consecutivă a recombinatului în celule stem embrionare (ES).

În cea de a doua etapă, celulele ES provenite din coloniile în care s-a produs recombinarea omoloagă sunt injectate într-un embrion tânăr de şoarece. Acesta va da naştere – dacă totul decurge normal – unui exemplar adult, aparent normal, heterozigot pentru gena mutantă; o parte din celulele acestui organism – şi în cazul fericit şi celulele liniei germinale – derivă din celulele stem embrionare infectate.

Prin încrucişarea masculilor şi femelelor astfel obţinute, 25% din pui vor fi homozigoţi pentru gena mutantă; analiza homozigoţilor transgenici permite studiul funcţiilor genei transfectate.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.: Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing Inc. New York & London, 1994;
2. Braunwald E., Isselbacher K.J., Petersdorf R.G., Wilson J.D., Martin J.B., Fauci A.S.: Harrisons' Principle of Internal Medicine, 13rd Edition, McGrawHill Comp.;
3. Cruce M., Cruce R.: Biologia moleculară a semnalizării celulare, Editura AIUS, 1995;
4. Emery A.E.H., Rimoin D.L.: Principles and Practice of Medical Genetics, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1983;
5. Gilbert F.S.: Developmental Biology, 4th Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 1994;
6. Hogan B., Constantini F., Lacy E. (eds): Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986;
7. Lehninger A.L.: Biochimie, Editura Tehnică, Bucureşti, 1987;
8. Maximilian C.: Genetica umană, Editura Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1982;
9. Niswander R.K. (ed): Manual of obstetrics; Diagnosis and Therapy, Little, Brown and Company (Inc);
10. Popescu O.V.: Electroforeza proteinelor în gel de poliacrilamidă, Editura Tehnică, Bucureşti, 1990;
11. Purves W.K., Orians G.H.: Life; the Science of Biology, Sinauer Associates Inc., Sunderland Massachusetts, 1987;

Scanned with OKEN Scanner

INTERACŢIA RECEPTOR-LIGAND DIN PERSPECTIVA BIOLOGIEI MOLECULARE

C. A. ŢAŢU ŞI T.I. OPREA

Introducere

La sfârşitul secolului trecut, în încercarea de a explica funcţiunile fiziologice ale unor molecule biologice (hormoni, neurotransmiţători), J. Langley introduce noţiunea de *receptor,* adică o structură care recunoaşte şi leagă specific un ligand potrivit. Conceptul este extins şi dezvoltat apoi de P. Ehrlich, în celebra sa teorie cu privire la formarea anticorpilor, şi de către E. Fischer, în la fel de celebra teorie despre specificitatea acţiunii enzimatice.

Delimitarea concretă a termenului nu este realizată decât în 1914, când H. Dale sesizează existenţa a două subtipuri de receptori colinergici (AchR): muscarinici, în sinapsele sistemului nervos vegetativ, activaţi de muscarină şi antagonizaţi de atropină, şi nicotinici, la nivelul joncţiunii neuromusculare, stimulaţi de nicotină şi antagonizaţi de curara. O împărţire asemănătoare a fost făcută pentru receptorii adrenergici, pe baza acţiunii adrenalinei şi noradrenalinei.

Azi, se cunosc numeroase subtipuri de receptori muscarinici, nicotinici, β sau α adrenergici, care leagă variaţi agonişti şi antagonişti. S-au descoperit şi izolat diferiţi alţi receptori pentru cele mai variate semnale extracelulare – hormoni, factori de creştere, lumină, stimuli odorifici etc. Indiferent de localizarea lor (pe membrana plasmatică, în citosol sau nucleu) sau de mecanismul prin care sunt diversificaţi – procesare alternativă a mRNA, editarea mRNA, modificări posttranslaţionale etc.–, ideea de specificitate este centrală conceptului de receptor biologic şi este motivul principal pentru care aceşti receptori nu se „încurcă" în acţiunile lor. În secţiunile care urmează sunt prezentate principalele tipuri de receptori celulari şi căile de semnalizare intracelulară cel mai frecvent recrutate. Majoritatea sistemelor de recepţie şi transducţie sunt, în esenţă, comune pentru toate celulele organismului, de aceea nu sunt privite dintr-un punct de vedere fix (imunologic, neurobiologic sau endocrin, spre exemplu), ele în sine contribuind la realizarea unui limbaj comun între celulele organismului.

Scanned with OKEN Scanner

Proteinele G şi receptorii lor cuplaţi (GPCR)

Mecanismul structură-funcţie al proteinelor G

Proteinele G (de la GTP/GDP-binding protein, proteine care leagă nucleotide guaninice) sunt larg utilizate în transducţia intracelulară a semnalelor de către cele mai variate celule eucariote, în cele mai diverse scopuri: neurotransmisie, acţiune hormonală, semnalizare intracelulară în sistemul imun (vezi divergenţa şi înrudirea secvenţială a subunităţilor G-α în seria mamiferelor din figura 1).

Ele sunt proteine membranare situate pe faţa internă a membranei celulare, fiind formate din trei subunităţi structurale (α, β, γ). Subunitatea α este codificată de mai multe alele şi conferă individualitate proteinei G. În funcţie de această subunitate, proteinele G pot avea funcţie activatoare (G_s), funcţie inhibitoare (G_i), pot activa fosfolipaza C (G_p) sau pot avea alte funcţii (G_q).

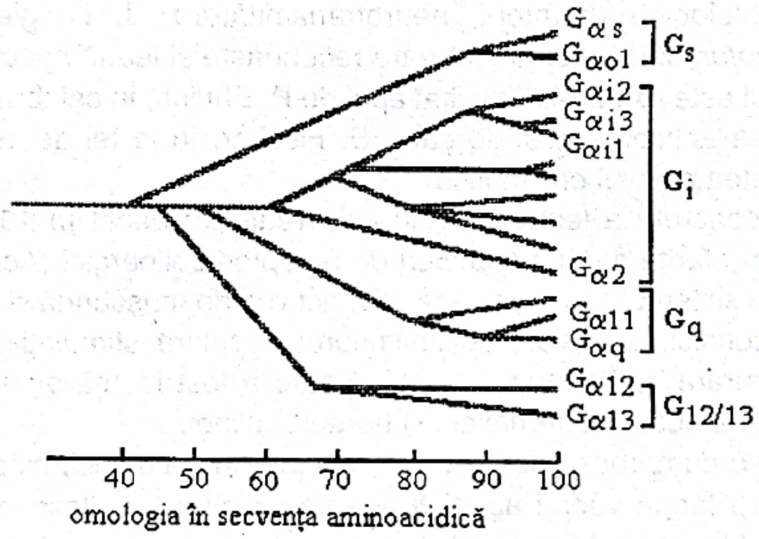


Figura 1

Legarea nucleotidelor GTP/GDP revine tot subunităţii α, care deţine şi o activitate GTP-azică intrinsecă. În forma activă, proteina G nu leagă GTP decât temporar, în stare de inactivitate, ea este complexată cu GDP.

Subunităţile β şi γ, deşi codificate fiecare de alele multiple, nu diferă prea mult secvenţial şi au rol de modulare a activităţii proteinelor G.

GPCR: caracteristici moleculare

Au fost clonaţi molecular peste 300 de receptori cuplaţi cu proteinele G, iar numărul lor total se preconizează a fi mai mare de 1000. Caracteristica structurală a acestor receptori este domeniul transmembranar, format din şapte α–helixuri

Scanned with OKEN Scanner

hidrofobe, conectate între ele prin șase bucle: trei extracelulare (EI-3) și trei intracelulare (II-3). Aceste helixuri au o conservare înaltă și permit împărțirea receptorilor în trei familii: 1. receptori pentru rodopsină β-adrenergici; 2. receptori pentru secretină/VIP (peptidul intestinal vasoactiv) și 3. receptori de glutamat metabotropici (mGluR). Liganzii extracelulari ai GPCR sunt și ei de o mare diversitate și fac parte din mai multe clase de molecule: *amine* (noradrenalina, adrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina), *aminoacizi* (glutamat, acid γ-aminobutiric), *nucleotide* și *nucleozide* (adenozina, ADP, ATP, UTP), *derivați de acizi grași* (tromboxani, leucotriene, prostaglandine), *molecule odorante, retinalul, proteine și peptide* (TRH, FSH, LH, IL-8, chemokine).

În buclele extracelulare E1 și E2 se găsesc două resturi cisteinice, care stabilizează topologic receptorul prin formarea unei punți disulfidice. Intracelular, spre capătul amino-terminal al buclei I2 se găsește secvența conservată Asp-Arg-Tyr, care deține un rol principal în transducția semnalului la proteina G atașată. Tot intracelular, spre capătul carboxi terminal al buclei I3 există resturi aminoacidice cu rol în activarea receptorului; mutații naturale ce apar în această regiune sunt responsabile pentru diferite boli (de exemplu adenomul toxic tiroidian, care se dezvoltă în urma mutațiilor survenite în receptorul TSH).

Activarea receptorilor GPCR și transmiterea semnalului la proteinele G atașate sunt explicate pe baza modelului *complexului ternar alosteric*. În mod constitutiv, receptorul este inactiv (R) și nu leagă proteina G. Fixarea ligandului specific induce activarea receptorului (R*) printr-o tranziție conformațională. Ansamblul ligand-receptor activat leagă mai departe proteina G. Interacția cu receptorul induce activarea proteinei G, cu scăderea afinității pentru GDP și creșterea afinității pentru GTP. Legarea GTP nu are loc decât temporar, datorită activității GTP-azice intrinseci a proteinei G, care hidrolizează GTP la GDP, cu restabilirea echilibrului inițial. Acest interval este însă suficient pentru transmiterea semnalului la efectori.

Efectorii asociați proteinei G

Efectorii controlați de proteinele G sunt, în principal, enzime, canale ionice și transportori membranari. Adenilat ciclaza este un model prototipic de enzimă reglată de proteină. Această enzimă este formată din 12 α-helixuri transmembranare, distribuite în două „buchete", și două domenii masive citoplasmatice, în ansamblu, structura fiind asemănătoare unui canal ionic (se presupune că o funcție primordială a adenilat ciclazei ar fi fost cea de canal ionic). Sub acțiunea adenilat ciclazei, ATP-ul este convertit în AMP ciclic (cAMP), unul dintre mesagerii secundari cei mai cunoscuți (vezi mecanismul semnalizării intracelulare prin proteine G din figura 2, unde legarea receptorului heptamembranar activează funcția GTP-azică a subunității G-α care, desprinsă de subunitățile G-β și G-γ, activează la rândul ei diverse proteine efector).

Scanned with OKEN Scanner

Adenilat ciclaza este controlată de proteinele G atât în sens negativ, cât și în sens pozitiv. Astfel, receptorul β-adrenergic, receptorul pentru glucagon, VIP și DI dopaminergic induc proteine G_s, care stimulează adenilat ciclaza. Alți receptori – cum ar fi receptorii muscarinici M2 și M4, α2-adrenergici, enkefalinergici – sunt cuplați unor proteine G_i, care blochează adenilat ciclaza. Dacă efectul stimulator poate să fie indus direct prin unitățile α_s, în urma disocierii heterodimerului βγ, mecanismul inhibiției este mai puțin clar. Se presupune că ansamblul βγ disociat de componenta α ar sechestra proteina α_s activată. Acest mecanism nu este exclus, deși poate fi vorba și de o acțiune a α_i.

Semnalizare intracelulară în celulele receptoare cu conuri și bastonașe necesită activitatea cGMP fosfodiesterazei, o altă enzimă controlată de proteina G. Sub influența luminii, rodopsina prezentă în segmentul fotoreceptor trece dintr-o formă inactivă (R) într-o formă activă (R*), prin conversia ligandului său, 11-*cis*-retinalul în *all trans* retinal. Mai departe, forma activă stimulează proteina G_i care, la rândul ei, activează cGMP fosfodiesteraza. Aceasta clivează cGMP în 5'-GMP și suprimă astfel un curent de Na^+, indus în absența luminii de către cGMP. Au loc astfel o hiperpolarizare membranară și o reducere a transmiterii impulsurilor de la retină.

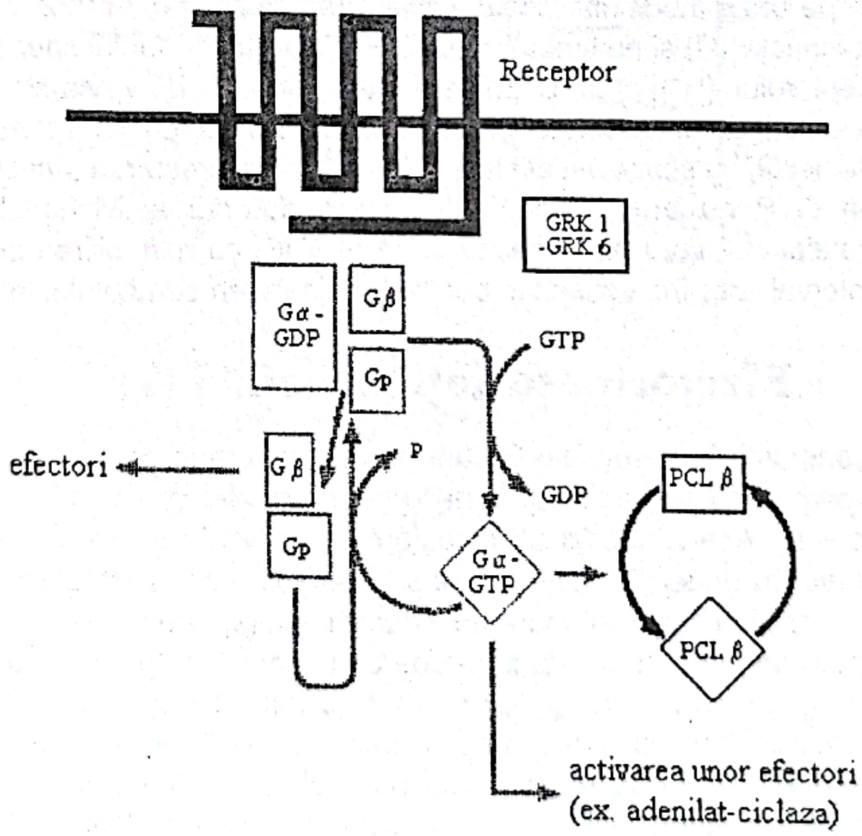


Figura 2

Scanned with OKEN Scanner

Fosfolipaza C(PLC) este o enzimă localizată pe faţa internă a membranei plasmatice. Există cel puţin trei izoforme, dintre care PLC-β este controlată de o proteină G (G_p). Sub acţiunea stimulatoare a G_p, fosfolipaza C clivează fosfatidil inozitol trifosfatul (PIP-2, localizat către faţa internă a membranei), cu formarea a doi mesageri secundari „consacraţi": diacil glicerolul (DAG) şi inozitol trifosfatul (IP3). DAG activează direct (împreună cu Ca^{2+}) protein kinaza C (PKC) – o enzimă de convergenţă a numeroase căi de semnalizare intracelulară –, iar IP3 leagă un receptor specializat din reticulul endoplasmic şi induce pe această cale un influx de Ca^{2+} în citosol. Calciul este unul dintre mediatorii intracelulari cu implicaţii în procesele celulare cele mai diverse de la proliferare la apoptoză.

Numeroase alte proteine par să fie controlate de proteine G, deşi datele nu sunt categorice. Aşa sunt unele canale ionice, transportori membranari (de glucoză, antiporterul Na^+/H^+) sau fosfolipaza A2 (PLA2), care eliberează din lipidele membranare acidul arahidonic, necesar pentru sinteza de tromboxan, leucotriene, prostaglandine.

Cele mai multe dintre acţiunile proteinelor G asupra canalelor ionice membranare sunt mediate de mesageri secundari, protein kinaze sau alte enzime care modifică structura şi funcţia acestor canale. În unele situaţii, efectul proteinelor G s-a dovedit a fi direct, mediat de subunitatea α. Un exemplu bun sunt canalele K^+ din inimă, care sunt activate direct de proteina G în prezenţa acetilcolinei, alte canale (de Ca^{2+} şi de Na^+) fiind controlate probabil într-un mod asemănător. Nefiind necesară sinteza unui mesager secund, acţiunea proteinelor G în aceste situaţii este rapidă şi realizează un cuplaj temporal cu alte mecanisme de semnalizare (de exemplu, activarea stimulantă a canalelor de Ca^{2+} independente de mesageri secundari şi a adenilat ciclazei, prin G_s).

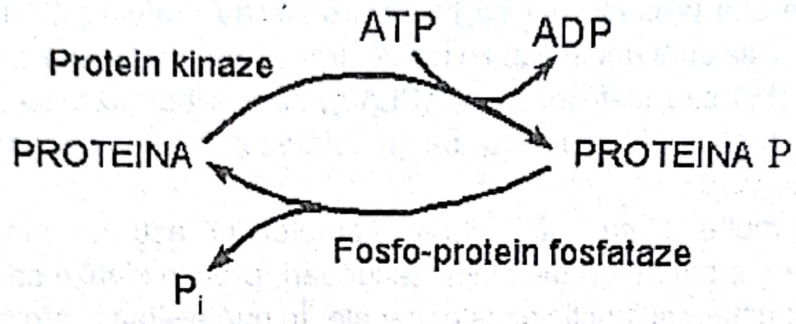
Tirozin kinazele

Fosforilarea proteinelor constituie unul din principalele mecanisme de reglare a proceselor celulare, fie că este vorba de celule eucariote sau procariote. Aceasta se realizează printr-o modificare simplă şi reversibilă, care foloseşte ATP ca sursă de fosfat şi energie. În plus, această reacţie este suficientă pentru a induce schimbări conformaţionale ale proteinelor ţintă, care favorizează interacţia acestora cu alte molecule, translocarea dintr-un compartiment în altul şi funcţiile lor. Reacţia este catalizată de către proteine kinaze, care reprezintă fosfotransferaze cu mare diversitate structurală, dintre acestea tirozin kinazele fiind unul din grupurile cele mai cercetate. Numeroase alte grupuri sunt cunoscute şi denumite după aminoacidul substrat pe care-l fosforilează: histidin-kinaze, lizin-kinaze, arginin-kinaze, cistein-kinaze etc. **(vezi figura 3).**

Scanned with OKEN Scanner

La eucariote, protein kinazele au în comun o regiune cu funcţie enzimatică, asociată unor porţiuni fără proprietăţi catalitice, heterogene structural. Regiunile noncatalitice sunt importante în localizarea intracelulară şi în modularea activităţii enzimatice. Pierderea capacităţii de autoreglare a protein kinazelor, secundar unor modificări structurale, poate fi, uneori, cauza malignizării celulare. Peste 50% din protooncogenele descrise până în prezent sunt protein kinaze.

Fosforilarea/Defosforilarea proteinelor



Reziduurile aminoacil fosforilate sunt Ser, Thr şi Tyr

Figura 3

Familia Src

Deşi se cunosc şi protein kinaze localizate liber în citosol, cele mai multe sunt ataşate unor receptori membranari pe care îi fosforilează în urma fixării agonistului endogen. Din această ultimă categorie face parte şi familia Src.

Familia Src include mai multe gene, dintre care trei au fost, iniţial, descoperite ca oncogene în genomul unor virusuri (virusul sarcomului Rous, virusul sarcomului aviar Yamaguchi, virusul sarcomului felinelor FGV). Protein tirozin kinazele (PTK) $pp60^{src}$, $p62^{yes}$, $p56(53)^{lyn}$ şi $p59^{fyn}$ sunt examinate în numeroase ţesuturi în proporţii variabile, în timp ce $pp56^{lck}$, $p55^{fgr}$, $p59(56)^{hck}$ şi $p55^{blk}$ sunt exprimate doar în celulele hematopoetice.

Structural, membrii familiei Src sunt compuşi din mai multe regiuni:

– un domeniu N-terminal scurt dipeptidic, care poate fi miristilat, cu rol probabil în ataşarea la membrană;

– o secvenţă unică (de circa 75–80 de aminoacizi), cu rol în interacţia cu alte proteine sau receptori de membrană;

Scanned with OKEN Scanner

– domenii SH2 (Src Homology) de circa 100 aminoacizi şi SH3, formate din aproximativ 50–60 aminoacizi, cu rol probabil în recunoaşterea substratului;
– un domeniu catalitic kinazic (20–30 aminoacizi), ce conţine o tirozină în poziţia 416, a cărei fosforilare creşte activitatea kinazică;
– un domeniu C-terminal cu rol inhibitor prin fosforilarea tirozinei 527.

Această structură modulară permite controlul riguros al activităţii kinazice, prin procese de fosforilare/defosforilare. Astfel, fosforilarea tirozinei din situsul catalictic creşte activitatea enzimatică, în timp ce fosforilarea tirozinei C-terminale are efecte inhibitorii. În funcţie de aceste variante, există trei situaţii: a. fosforilarea tirozinei 527, C-terminale, reduce activitatea enzimatică la 5–10%; b. fosforilarea tirozinei 416 din situsul catalitic creşte activitatea kinazică la 100% şi c. fosforilarea tirozinei 416, concomitent cu defosforilarea tirozinei 527, creşte substanţial funcţia catalitică la 200–300%. Proporţia protein tirozin kinazelor aflate în fiecare din aceste stări funcţionale este dependentă de activitatea kinazelor tip Csk a fosfatazelor (CD45), cu rol modulator şi reglator (vezi figura 4).

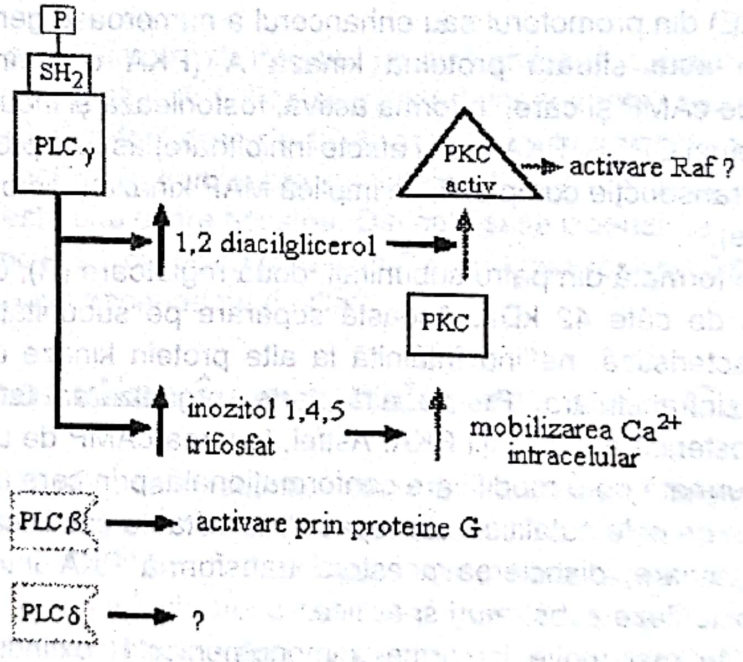


Figura 4

Mesagerii secundari şi acţiunile lor

Existenţa unor molecule intracelulare care transmit semnalul de la sistemele receptor la cele efector a fost intuită de E. Sutherland, cu câteva decenii în urmă. Numărul mesagerilor secundari este mic, în comparaţie cu cel al receptorilor

Scanned with OKEN Scanner

celulari sau al efectorilor, aceiaşi mesageri fiind utilizaţi pe căi de semnalizare diferite şi în variate tipuri celulare.

Cei mai mulţi dintre aceşti mésageri au o dimensiune moleculară mică, ceea ce permite difuzia lor rapidă în celulă şi inducerea efectelor lor funcţionale. O altă caracteristică este metabolizarea şi inactivarea lor rapidă, după ce acţiunea lor nu mai este necesară.

cAMP

Mesager secundar cunoscut, cAMP serveşte numeroase căi de semnalizare în celulă, cele mai multe cu punct de plecare în receptorii heptamembranari cuplaţi cu proteina G. Sinteza cAMP este catalizată de adenilat ciclază, iar inactivarea sa se face de către cAMP fosfodiesteraza.

Semnalul preluat de către cAMP este tradus la nivelul nucleului prin legarea proteinei CREB (cAMP Response Element Binding Protein) de secvenţa de control specifică (CRE) din promotorul sau enhancerul a numeroase gene. Intermediar pe această cale este situată proteina kinaza A (PKA o serin/treonin kinază), dependentă de cAMP şi care, în forma activă, fosforilează şi induce capacitatea de legare a proteinei CREB. PKA are şi efecte inhibitoare, asupra proteinei Raf, situată pe o cale de transducţie complexă, ce implică MAP kinaza (Microtubule Associated Protein kinaze).

PKA este formată din patru subunităţi, două reglatoare (R), de 50 kDa şi două catalitice (C), de câte 42 kDa. Această separare pe subunităţi a funcţiilor este oarecum caracteristică, nefiind întâlnită la alte protein kinaze uzual implicate în semnalizarea intracelulară. Pe de altă parte, organizarea tetramerică permite modularea alosterică a activităţii PKA. Astfel, legarea cAMP de un situs specific al enzimei este urmată de o modificare conformaţională, prin care unităţile reglatoare sunt desprinse de cele catalitice. „În repaus", activitatea catalitică este inhibată de domeniile reglatoare; disocierea acestora transformă PKA într-o kinază activă, capabilă să fosforileze substraturi specifice.

Prezenţa în mai multe izoforme a monomerilor R extinde mecanismul de modulare a PKA. Astfel, subunitatea notată RII-B se găseşte doar în celulele nervoase (unde este frecvent colocalizată cu proteina MAP), în timp ce izoforma RII-H se găseşte în ţesutul cardiac şi în alte ţesuturi non-neuronale.

Un rol inhibitor al activităţii PKA se atribuie unor peptide intracelulare, care conţin secvenţe „pseudosubstrat", care mimează şi concurează substraturile naturale fosforilabile de către PKA. Pe baza acestor secvenţe au fost constituite peptide „momeală", care inhibă nu numai funcţia PKA, dar şi a altor kinaze (PKC, MAP-kinaza etc.).

Scanned with OKEN Scanner

Ca^{2+} în rolul de mesager secundar

Concentrația intracelulară de Ca^{2+} este de circa 1000 de ori mai mică decât cea extracelulară, această diferență fiind menținută prin acțiunea unor pompe membranare specializate. Astfel o ATP-ază expulzează din celulă un ion de calciu pentru fiecare moleculă de ATP consumată, iar o proteină de schimb Na^+/Ca^{2+} elimină un ion de Ca^{2+} pentru fiecare trei ioni de Na^+ introduși în celulă.

În interiorul celulei, Ca^{2+}, de asemenea, nu se găsește liber în citosol decât în concentrație mică, restul fiind legat de proteine intracelulare (calmodulina etc.) sau stocat în sacii reticulului endoplasmic și mitocondrii. Membrana RE prezintă și ea o ATP-ază care pompează spre interior trei ioni de Ca^{2+} pentru o moleculă de ATP consumată. În membrana RE există și un receptor pentru IP–3, prin care, în prezența ligandului, Ca^{2+} este eliberat în citosol. Acest receptor are omologie cu receptorul ryanodinic, fiind format din patru subunități; spre capătul C-terminal este organizat în șapte domenii hidrofobe care, în ansamblu, ar forma un canal de calciu.

Sub acțiunea unor stimuli extracelulari care modulează canalele de Ca^{2+} din membrana plasmatică (canalele voltaj- sau ligand-dependente) sau sub acțiunea unor semnale care induc formarea de IP-3, are loc creșterea pulsatilă a Ca^{2+} în citosol. Acesta va activa în continuare enzimele efector din citosol sau nucleu. Proteina kinaza C este una dintre acestea. Din cele șase izoenzime, doar trei ($\alpha\beta\gamma$) necesită pentru funcția lor catalitică prezența Ca^{2+} (în asociere cu DAG). Celelalte trei ($\delta\varepsilon\xi$) sunt mai puțin dependente de Ca^{2+}.

Calmodulina în semnalizarea prin Ca^{2+}

O proteină de 15 kDa, calmodulina, este una dintre principalele proteine intracelulare care intermediază efectele transducționale ale Ca^{2+}. Calmodulina are patru situsuri de legare de Ca^{2+}, care flanchează, de-o parte și de alta, așa-numita structură EF-hand, compusă din trei α-helixuri dispuse în forma literei Z. Activarea calmodulinei are loc doar atunci când concentrația citosolică a Ca^{2+} atinge valori micromolare, dar nu și la concentrația de „repaus" a Ca^{2+}. Complexul Ca^{2+}/calmodulină activează mai departe numeroase enzime: protein-kinazele Ca^{2+}/calmodulină (CaM)-dependente, ciclic-nucleotid fosforilaze, NO sintetaza, calcineurina (o serin/treonin fosfatază importantă în semnalizarea intracelulară în neuroni și limfocite). Dintre protein-kinazele CaM dependente, mai bine caracterizate sunt MLCK (Myosin Light Chain Kinase) și kinazele CaM I-III. MLCK este prezentă în celulele musculare, dar și în neuroni, unde fosforilează o miozină non-musculară. Kinaza CaM I fosforilează sinapsina I (o componentă a veziculelor sinaptice) la o

Scanned with OKEN Scanner

poziţie serinică şi intervine în eliberarea neurotransmiţătorilor, iar kinaza CaM III fosforilează factorul de elongaţie translaţional eEF-2 şi inhibă sinteza proteică. CaM II kinaza este o proteină majoritară în creier (2% din totalul proteinelor în hipocamp) şi are substraturi multiple: MAP_2, tubulina, sinapsina I, tirozin-hidroxilaza, triptofan-hidroxilaza. Are o structură dodecameră, asamblată prin heteromerizarea a cel puţin cinci izoforme distincte (α,β,β',γ, δ) cu distribuţie tisulară specifică.

Activarea ei prin Ca^{2+}/calmodulină se însoţeşte de autofosforilarea în poziţia ^{286}Thr, ceea ce îi conferă mai departe o funcţie catalitică Ca^{2+}- independentă. Aceasta persistă (la valori de 10 ÷ 30% din valoare maximală) până în momentul în care enzima este defosforilată sub acţiunea fosfatazelor. Durata de acţiune este prin urmare dependentă de concentraţia Ca^{2+} şi activitatea fosfatazică şi ar reprezenta un mecanism de stocare *„in situ"* a informaţiei, CaM II kinaza fiind, probabil, implicată în mecanismul memoriei neuronale şi, posibil, imunologice.

IP3 şi DAG

Oxidul nitric (NO) în semnalizarea intracelulară

Una dintre enzimele activate în urma creşterii concentraţiei intracelulare a Ca^{2+} este şi NO sintetaza. Ea catalizează oxidarea grupării guanidino din L-arginină, cu formarea de L-citrulină şi oxid nitric. Oxidul nitric are o viaţă scurtă (3 ÷ 5 s, fiind convertit în NO_2^- şi NO_3^-), suficientă însă pentru inducerea unor efecte funcţionale. Astfel, prin legarea receptorilor muscarinici de pe celulele endoteliale de către acetilcolină, este declanşată producţia de IP–3 care eliberează Ca^{2+} din depozitele intracelulare. Consecutiv, are loc activarea NO sintetazei, cu eliberarea de NO pe calea descrisă. Acesta difuzează rapid din celulele endoteliale în celulele musculare netede, unde activează o guanilat ciclază, prin legarea unei grupări hemice din structura sa. Este sintetizat astfel cGMP, cu relaxarea fibrei musculare netede.

Un mecanism similar de cooperare intercelulară există în cerebel; în acest caz oxidul nitric este produs în celulele granulare în urma stimulării receptorilor NMDA şi creşterea concentraţiei Ca^{2+} în celulă. NO difuzează în continuare în celulele Purkinje, unde participă la semnalizarea intracelulară.

Oxidul nitric poate să fie o moleculă semnalizatoare utilizată în variate sisteme celulare, fiind obiectul a numeroase cercetări actuale.

Receptorii nucleari

Cei mai mulţi receptori pentru semnale extracelulare sunt localizaţi în membrana celulară sub forma unor proteine integrale cu capacitate intrinsecă de transducţie sau asociate unor proteine transductor. Majoritatea celulelor animale, de la nevertebrate până la vertebratele cele mai complexe, posedă însă şi molecule

Scanned with OKEN Scanner

receptor pentru unii hormoni şi mesageri nonpeptidici, localizarea lor fiind în citosol sau în nucleu. În această categorie intră receptorii pentru unii hormoni – de exemplu steroizi (estrogeni, progesteron, androgeni, glucocorticoizi, mineralocorticoizi, iar la *Drosophila* – receptorul de ecdyson), hormonii tiroidieni (T_3, T_4), receptorii pentru acid retinoic şi vitamina D_3 (vezi domeniile structurale ale receptorilor nucleari din figura 5).

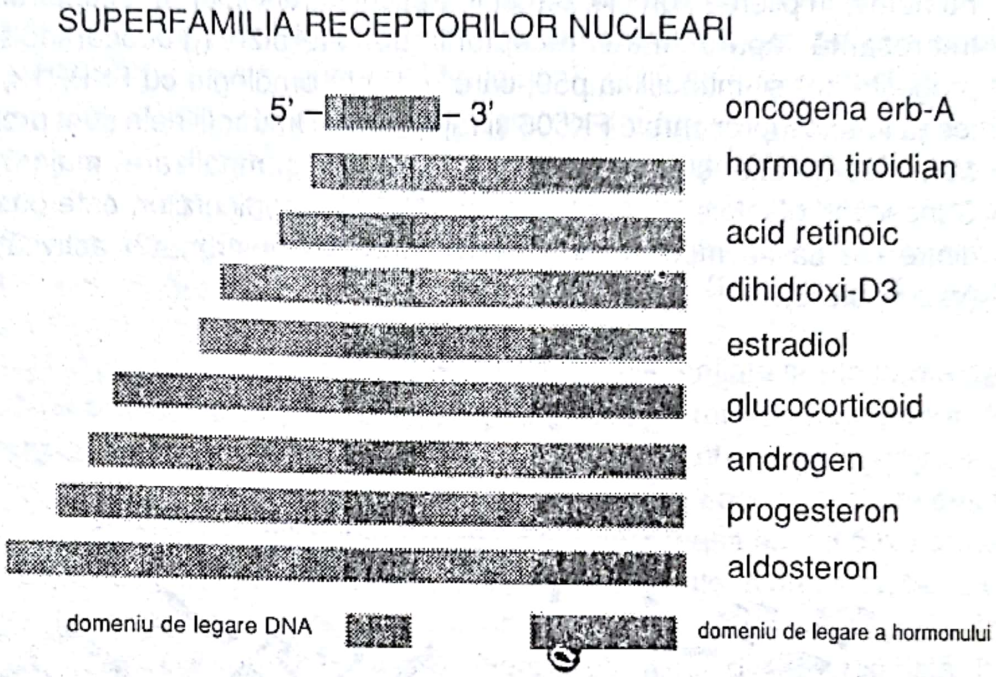


Figura 5

Spre deosebire de receptorii membranari, a căror semnalizare intracelulară necesită o cascadă de mesageri secundari, în cazul receptorilor nucleari, astfel de mesageri nu sunt necesari. Ei au acces direct la secvenţele DNA şi se comportă ca adevăraţi factori transcripţionali cu funcţie în general transactivatoare. Deşi omologi ai receptorilor nucleari la bacterii nu se cunosc, ei se aseamănă mecanistic cu aporepresorul din modelul represiei genice a lui Jacob şi Monod. Cu alte cuvinte, fixarea agonistului endogen (hormonul steroid, acidul retinoic etc.) induce o modificare alosterică în structura receptorului, cu dezvelirea unor situsuri de localizare nucleară şi a motivelor de legare DNA; ansamblul hormon-receptor este în continuare translocat în nucleu, unde leagă o regiune DNA specifică (HRE, Hormone Response Element) din enhancerul unor gene şi determină activarea acestora.

Localizare, structură şi mecanism de acţiune

Datele privind localizarea intracelulară a receptorilor de hormoni steroizi/tiroidieni sunt destul de controversate. După sinteza lor în citoplasmă, este posibil ca aceşti receptori să fie transportaţi în nucleu sau către membrana nucleară (în forma

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

nativă, nelegată de hormon), unde are loc interacţia cu ligandul specific. Alte observaţii susţin (cel puţin pentru receptorul de glucocorticoizi, GR) localizarea în citoplasmă până în momentul interacţiei cu hormonul, când are loc decamuflarea secvenţelor de localizare nucleară şi deplasarea în nucleu.

Deseori, receptorii de hormoni steroizi au fost izolaţi în ansambluri heteromerice cu proteinele de şoc termic în familia *hsp90* şi *hsp70*. Ele ar avea rol nu numai în plierea corectă, dar şi în traficul intracelular al receptorului. O asociere interesantă apare între receptorii de steroizi (glucocorticoizi, estrogeni, progesteron) şi imunofilina p59, care prezintă omologie cu FKBP12, proteină care leagă imunosupresoarele FK506 şi rapamicina. Imunofilinele sunt prolil-peptidil, *cis, trans* izomeraze şi intervin într-o cale de semnalizare majoră în limfocite. Cunoscând efectele imunosupresoare ale glucocorticoizilor, este posibil ca o parte dintre ele să fie mediate prin interferarea (sechestrarea?) activităţii ciclofilinelor (vezi figura 6).

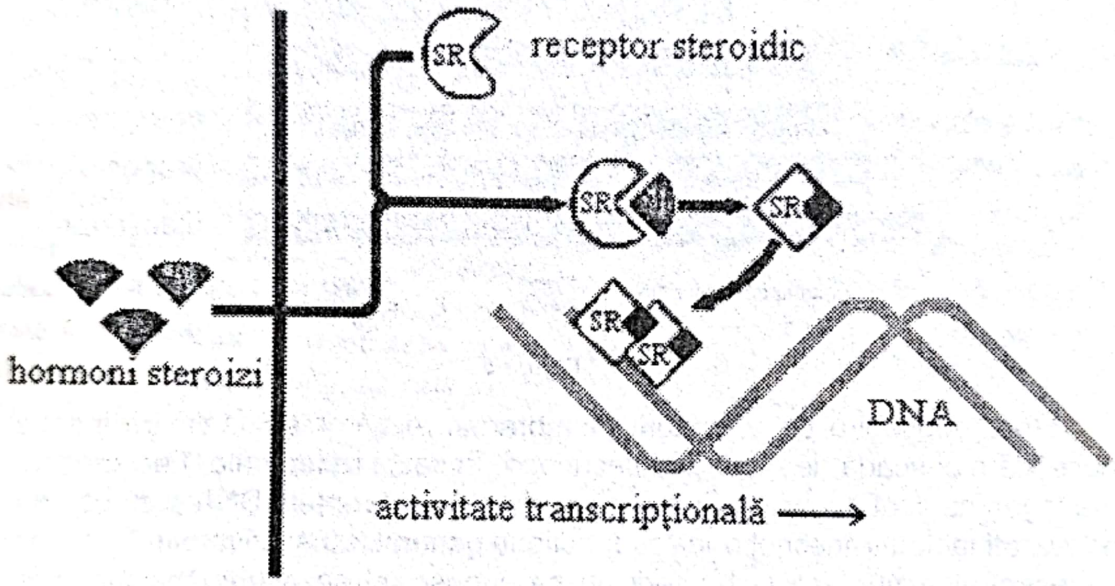


Figura 6

În structura primară, receptorii de hormoni steroizi/tiroidieni prezintă trei regiuni principale. Spre capătul carboxi-terminal se găseşte situsul de legare al hormonului (aproximativ 250 de aminoacizi); urmează o secvenţă de circa 70 aminoacizi care formează două module de tip Zn-finger, cu rol în legarea DNA, iar amino-terminal se găseşte o regiune TAF-1 (Transcription Activation Function) cu rol de modulare a transcripţiei. În secvenţa de legare a DNA au fost identificate 10 resturi Cys, dar numai 8 participă la formarea celor două motive Zn-finger; aceste module sunt codificate de doi exoni diferiţi, ceea ce sugerează că ele nu formează o unitate structurală, cum este cazul altor proteine de legare DNA ce conţin Zn-finger. Între secvenţa de legare a hormonului şi cea de legare a DNA au fost identificate o

regiune „balama" şi resturi cu rol în semnalizarea transportului către nucleu. După cum sugerează şi numele, regiunea „balama" ar interveni în flexibilizarea moleculei şi, prin aceasta, în camuflarea regiunii de legare DNA în absenţa ligandului şi descoperirea ei în urma fixării acestuia.

Ca multe alte molecule alosterice, inclusiv modulatorii transcripţionali de la bacterii despre care am amintit, receptorii nucleari au o structură multimerică. De exemplu, cel pentru progesteron este format din două subunităţi: PR-A (de 79 kDa) şi PR-B (de 108 kDa). Ele rezultă printr-o iniţiere translaţională alternativă a unui mRNA comun. Receptorii pentru hormonul tiroidian T_3 (TR) se formează şi ei prin dimerizarea unor subunităţi TRα şi TRβ codificate de două gene diferite. În cazul receptorilor pentru acizi retinoici (RAR), au fost puse în evidenţă cel puţin şase gene omologe care codifică subunităţile receptorului; trei sunt incluse într-o subfamilie RAR, iar celelalte trei într-o subfamilie RXR (receptori x retinoidici). Aceste proteine formează ansambluri heterodimerice (RAR*RXR, care leagă acidul 9-*cis*-retinoic), toate cu rol de transactivator genic.

În unele tumori (cancer mamar, de prostată) au fost evidenţiate şi alte forme de receptor, rezultate probabil printr-o procesare defectuoasă a mRNA, care perturbă acţiunea fiziologică a receptorului. Astfel, tamoxifenul (un antagonist estrogenic) prin legarea receptorului estrogenic normal blochează acţiunea acestuia şi are efect anti-oncogenic. Situaţia se schimbă însă dacă celula canceroasă exprimă izoforme mutante ale receptorului, care sunt activate, în loc să fie inhibate în prezenţa tamoxifenului. Acelaşi lucru se întâmplă în unele cancere de prostată, când mutaţiile în receptorul androgenic convertesc acţiunea hidroxiflutamidei din antagonistă în agonistă, cu riscul potenţării oncogenezei. Prin aceste studii s-a demonstrat că ER şi PR apar în forme diferite, ceea ce sugerează că tumorile neoplazice sunt colecţii de clone (cancere cu celule diferite, cel puţin la nivelul receptorilor nucleari).

Interacţia cu hormonul şi DNA

Viziunea conform căreia receptorii nucleari fixează DNA şi transactivează genele responsive, doar în prezenţa hormonului, este astăzi periclitată de descoperirea unei funcţii de legare a DNA şi chiar de transactivare şi în absenţa hormonului. Acest lucru este valabil pentru receptorii de steroizi; nu se ştie dacă şi ceilalţi receptori nucleari au o asemenea capacitate. Funcţia transactivatoare independentă de ligand s-ar datora regiunii amino-terminale TAF-1. O altă descoperire surprinzătoare este şi modularea (ligand independentă) a receptorilor de steroizi pe căi transducţionale intracelulare comune unor receptori membranari. De exemplu, în celulele HeLa care conţin ER, expresia genei pentru lactoferină (gena ER-dependentă) poate fi indusă prin activarea receptorilor EGF, prezenţi pe suprafaţa acestor celule.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a obţine o transactivare genică puternică, în cele mai multe cazuri nu este suficientă doar regiunea modulatoare TAF-1. O altă regiune (TAF-2), localizată la nivelul situsului de legare al hormonului, deţine un rol crucial. Această regiune este activată prin legarea hormonului specific, iar unii antagonişti hormonali (RU486, un antiprogestinic şi antiglucocorticoidic) blochează tocmai rolul modulator-activator al acestei regiuni, în timp ce regiunea TAF-1 este neafectată. Legarea hormonului natural este urmată şi de o hiperfosforilare a receptorului la reziduuri serinice, al căror rol este puţin înţeles.

Fixarea de secvenţe DNA

Ansamblul receptor-ligand recunoaşte secvenţe DNA specifice (HRE) situate în regiuni enhancer ale genelor. Deşi rolul hormonilor steroizi/tiroidieni/retinoizi este major în dezvoltarea şi diferenţierea organismului, până acum se cunoaşte doar un număr mic de gene activate de receptori nucleari, care nu reprezintă exemplele cele mai relevante. Astfel sunt genele pentru prolactină, transactivată în celulele hipofizei anterioare, de către ER, gena pentru osteocalcină, indusă de către receptorul de vitamină D3 (VDR) sau gena pentru un transportor anionic cu rol în diferenţierea eritroblaştilor, indusă de receptorul de hormoni tiroidieni.

Legarea de secvenţele DNA se face prin motivele Zn-finger şi implică şi alte proteine nucleare, cu rol de adaptor sau de cofactor (OTF-1 şi NF-1). În mod constitutiv, situsul de legare NF-1 este orientat spre interiorul nucleozomului fiind inaccesibil factorului nuclear; fixarea receptorului nuclear de HRE induce reconfigurarea spaţială a cromatinei, ceea ce permite legarea proteinei NF-1 şi activarea genică.

Receptorul ER fixează enhancerul specific în ansamblu cu Pit-1, o proteină care conţine un homeodomeniu. Legarea este urmată de supraspiralizarea negativă a DNA şi posibila stabilizare a unei structuri non-B, care reţine ER şi alte proteine nucleare. Se presupune că are loc şi o îndoire (bending) a catenelor DNA, care pune în contact fizic ansamblul ER-Pit-1 cu alte proteine cu rol transcripţional. Pentru receptorul de vitamina D s-a evidenţiat asamblarea cu proteina NAF (Nuclear Accesory Factor), iar pentru receptorii de acid retinoic, asocierea cu subunitatea RXR (care funcţional ar fi similară NAF) ar oferi funcţia de cofactor necesară transactivării.

În afară de mecanismul clasic descris de interacţie cu DNA, unele din acţiunile receptorilor nucleari s-ar putea datora unor mecanisme mai puţin ortodoxe, cum ar fi: modificarea nespecifică a fluidităţii membranei, activare specifică a unor receptori membranari şi inducerea unei căi de semnalizare intracelulară, iar în sistemul nervos central, modularea neurotransmisiei prin legarea receptorilor gabaergici $GABA_A$.

Scanned with OKEN Scanner

Receptorii nucleari: factori transcripţionali duali

Ce ar putea face receptorii nucleari în absenţa ligandului este o întrebare la care s-a răspuns de curând, cel puţin în cazul TR şi RAR. Aceşti receptori, în condiţii de „repaus", sunt fixaţi de DNA printr-o proteină „adaptor" (SMTR-Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptor) şi par să represeze transcripţia unor gene. În urma fixării ligandului natural (hormonul etc.), SMTR se desprinde, iar receptorul nuclear trece în forma derepresată, cu efect activator. Este posibil ca alterări ale modulării transcripţionale prin SMTR sau alte proteine nucleare cu acţiune similară să fie responsabile pentru inducerea unor leucemii prin RAR şi TR, în absenţa ligandului. Funcţia de factori represori ar putea fi considerată faţa Yin a receptorilor nucleari şi, în acelaşi timp, un exemplu de eficienţă prin exploatarea resurselor moleculare ale celulei.

Receptorii „orfani"

Un rol modulator al activităţii receptorilor nucleari par să îl aibă şi receptorii „orfani". Secvenţial, ei fac parte din familia receptorilor pentru hormoni steroizi/tiroidieni, însă nu prezintă vreun ligand cunoscut, endogen sau exogen. Unul dintre aceşti receptori orfani, SHP (Small Heterodimer Partner), descoperit recent, conţine doar domeniul de fixare al ligandului şi regiunea de dimerizare, nu însă şi secvenţa înalt conservată de fixare a DNA. SHP poate interacţiona cu receptorii retinoidici şi pentru hormonii tiroidieni, inhibându-le funcţia transactivatoare. Un alt receptor orfan (COUP) pare să intervină în modularea negativă a activităţii receptorilor retinoidici, dependentă de vârstă. Prin urmare, receptorii nucleari „orfani" au un comportament asemănător unor proteine virale sau celulare, care, prin oligomerizare, blochează funcţia unor proteine cu rol în proliferarea celulară (p53, Myc etc.). Deşi neconfirmat, ei ar putea fi şi o momeală pentru hormonii specifici, pe care îi leagă în competiţie cu receptorul natural.

Numărul receptorilor orfani este în continuă creştere, iar căutarea de liganzi naturali capabili să lege aceşti receptori este asiduă. Recent, au fost identificaţi cel puţin trei astfel de liganzi. Primul este acidul 9–cis–retinoic, care leagă specific şi cu afinitate mare RXR şi are proprietăţile unui potenţial hormon. Alţi doi omologi, acidul 1'-glucozil-9-*cis*-retinoic şi 4-oxo-all-*trans*-retinoaldehida par să fie şi mai activi în legarea RXR.

Proteinele PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) sunt codificate de trei gene, α, β şi γ şi aparţin structural familiei receptorilor nucleari. Până nu de mult liganzii lor nu erau cunoscuţi. S-a demonstrat însă că PPARα poate fi activat de plastifianţi industriali şi poate lega acizi graşi cu catenă lungă (linoleic, linolenic, oleic). Aceşti acizi nu activează receptorul PPARα care leagă însă acidul arahidonic

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

și derivatul 15-deoxi-$D^{12,14}$ al prostaglandinei J2, fiind, probabil, implicat în metabolismul glucoze și transdiferențierea fibroblaștilor în adipocite.

Alte exemple de liganzi naturali ar fi derivații farnezil, care leagă receptorul FXR, și melatonina, care recunoaște dimerul RZR/ROR. Rolul acestor interacții este necunoscut, deși, în ultimul caz, melatonina ar putea oferi o explicație pentru prezența motivului secvențial PAS în structura unora dintre acești receptori (vezi mai jos).

O clasificare în funcție de modul de interacție cu DNA a receptorilor nucleari este redată în tabelul următor:

Tabelul 1. Clasificarea în cinci grupe a receptorilor nucleari după criteriul legării DNA

Clasa	Legare DNA	Receptor	Ligand
receptori steroidici	homodimer	ER, AR, MR, GR	hormoni steroizi
receptori clasa II	heteodimer	VDR, TR3, RAR, PPARγ	vitamina D3 triiodotironina *all-trans*-retinoat 15-deoxi-$D^{12,14}$ prostaglandina J2
receptori orfani I	monomer	RZR/ROR	melatonina
receptori orfani II	homodimer	RXR	9-cis-retinoat
receptori orfani III	heterodimer	FXR/RIP14	derivați farnezil

Receptorii pentru dioxine

Din punct de vedere al ligandului, receptorii Ah (Aryl hydrocarbon) ar putea fi considerați orfani, deoarece ei nu leagă vreun ligand endogen cunoscut. În schimb, ei fixează destul de specific molecule toxice din mediu, de tipul dioxinelor (2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxine, TCDD) care funcționează ca disruptori endocrini prin interferarea proceselor de sexualizare și de creștere și diferențiere a celulelor. Inițial, acești receptori au fost identificați în țesutul hepatic de la șobolan, pentru ca ulterior să fie evidențiați în numeroase alte structuri tisulare – miocard, mușchi scheletic, limfocite, tumori mamare. În mod curios, inactivarea AhR, așa cum s-a demonstrat pe șoareci transgenici knock-out pentru gena AhR, afectează mai puțin procesul de embriogeneză, însă determină o mortalitate postnatală crescută prin scurtarea duratei de viață a limfocitelor și fibrozare hepatică.

Receptorii Ah sunt oarecum arbitrar incluşi în superfamilia receptorilor pentru hormoni steroizi/tiroidieni, deoarece nu prezintă în structura lor motive Zn-finger. Ei leagă DNA printr-un domeniu b (basic) localizat spre capătul aminoterminal al moleculei şi urmat de o regiune HLH (Helix Loop Helix) cu rol în dimerizare. Această regiune se continuă cu o secvenţă de omologie PAS, identificată până în prezent doar în patru proteine: Ah, Arnt (Ah receptor nuclear translocator) şi proteinele Sim (cu rol în neurogeneză) şi Per (cu rol în controlul ritmului circadian) de la Drosophila. Domeniul Pas (de la Per, Ah-Arnt, Sim) are rol în fixarea ligandului. Spre extremitatea carboxi-terminală se găseşte o regiune bogată în glutamină (Q) care intervine în transformarea receptorului – trecerea din forma inactivă în cea activă, capabilă să lege DNA.

Receptorul Ah are 210 kDa şi este compus din molecula receptoare propriu-zisă, de 100 kDa şi o moleculă accesorie de 110 kDa (Arnt). S-au evidenţiat şi ansambluri cu Hsp90, probabil cu rol în plierea şi transportul intracelular. Mecanismul de activare al acestor receptori ar fi următorul: într-o primă fază, dioxina leagă receptorul, urmează apoi transportul în nucleu şi legarea unei secvenţe genice specifice (DRE Dioxin Response Element, AHRE Ah Receptor Element sau XRE Xenobiotic Response Element) prezente în diferite gene. Aceste gene pot fi distribuite în două grupe mari: unele cu rol în proliferarea şi diferenţierea celulară (EGF-R, TGF-a, TGF-b2, PAI-2, c-fos, c-jun) şi altele care codifică enzime de detoxificare: glutation S transferaza, aldehid dehidrogenaza 3c, UDP glucuronozil transferaza etc. Este posibil ca ele să fie induse de izoforme diferite ale receptorului Ah într-o manieră tisular specifică.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Gotto jr. A. M, O'Malley B. W. (ed): The role of receptors in Biology and Medicine, Raven Press, New York, 1986;

2. Coleman D. E., Sprang S. R: How G-proteins work: a continuing story. TiBS, 1996, 21, 41;

3. Dennis E. A: The growing phospholipase A_2 superfamily of signal transducing enzymes. TiBS, 1997, 22, 1.

4. Inglese J., Koch W. J, Touhara K., Lefbowitz R. J: GBγ interactions with PH domains and Rass-MAPK signalling pathways. TiBS, 1995, 20, 151;

5. James P. D, Vorherr T., Carafoli E.: Calmodulin binding domains: just two faced or multifaced. TiBS, 1995, 20, 38;

6. Pattson T.: Protein modules and signalling network, Nature, 1995, 373, 573;

7. Proud, C. G: Translation-turned on by insulin, Nature, 1994, 371, 747;

8. Roy A. K, Clark J. H. (ed.): Gene Regulation by Steroid Hormones III. Springer, New York, 1987;

9. Wittinghoffer A., Nassar N.: How Ras-related proteins talk to their effectors. TiBS, 1996, 21, 488;

Scanned with OKEN Scanner

SPECIFICITATE ÎN INTERACŢIA RECEPTOR–EFECTOR

Z. SIMON

Receptori şi efectori [3]

În sens restrâns, *receptori* sunt macromoleculele de pe membrana celulară, din citoplasmă sau din nucleu care interacţionează cu mesageri chimici naturali (hormoni, neurotransmiţători) numiţi efectori. În urma acestei interacţii, macromolecula receptor catalizează, în general, formarea unui mesager secundar şi, prin aceasta, transmite celulei informaţia dată de mesagerul chimic. În sens larg, ca receptori sunt privite şi enzime, acizi nucleici, proteine structurale, imunoglobuline (anticorpi), iar *efectori* – substratul transformat în produs, proteine reglatoare ale transcripţiei, antigene care leagă anticorpi etc.

Este uzuală denumirea de *ligand* pentru molecule care interacţionează cu receptorul, fiind incluşi în această categorie atât efectorul natural, cât şi molecule sintetice care leagă receptorul. Se vorbeşte de *agonişti* pentru molecule care produc aceeaşi acţiune asupra receptorului, ca şi efectorul (mesagerul chimic) natural, iar de *antagonişti* de molecule care leagă receptorul şi împiedică prin aceasta acţiunea biologică a mesagerului natural sau a unor molecule agonist. Există şi *agonişti parţiali,* care leagă receptorul, dar produc, chiar şi la concentraţii mari, o activitate biologică mai slabă decât efectorul natural. Ca exemplu, multe enzime au receptori pentru molecule cu caracter de activator al enzimei, iar legarea unui agonist parţial va induce o activitate catalitică mai redusă decât legarea unui agonist.

Situsul de combinare al receptorului este regiunea moleculei receptor care intră în contact direct cu molecula de ligand.

Specificitatea interacţiei receptor-efector constă în aceea că receptorul leagă (este activat de) numai molecula efectorului natural, nu şi alte molecule din organism cu care vine în contact.

Scanned with OKEN Scanner

Consideraţii de echilibru chimic pentru interacţia receptor-ligand [2]

Procesele din celulă pot fi considerate, în genere, că pornesc în urma interacţiei unui *efector* (mesager chimic, ligand, L) cu un *receptor biologic.* De exemplu, proteina represor (efector) se combină cu gena operator (receptor) şi blochează transcripţia genelor operonului bacterian. Sau, un hormon steroid (efector) se combină cu un anumit factor de transcriere (receptor), ducând la activarea transcripţiei unei gene de sinteză. Sau, un metabolit (efector) este transformat, sub acţiunea catalitică a unei enzime (receptor) în altă moleculă – în cursul unui lanţ de reacţii metabolice.

De regulă, interacţia receptor (R)-efector (L_i) poate fi considerată ca un echilibru chimic care duce la un complex C_i^*, iar procesul celular pornit, activitatea biologică A_i, este proporţională cu fracţiunea din receptor transformată în complex:

$$R + L_i \leftrightarrow C_i^*; \qquad A_i = A_{max}\frac{[C_i^*]}{[R]+[C_i^*]} = A_{max}\Theta_i \tag{1}$$

Echilibrul chimic corespunzător disocierii complexului, C_i^*, este:

$$\frac{[R][L_i]}{[C_i^*]} = K_i = e^{-\Delta G_i/RT} \tag{2}$$

unde ΔG_i este afinitatea lui L_i pentru R_i (entalpia liberă de disociere), iar K_i – constantă de disociere a complexului receptor-ligand.

La procesele controlate cinetic şi în tot cazul pentru reacţiile enzimatice la care viteza este proporţională cu $\exp(-\Delta G_i^{\#}/RT)$, $\Delta G_i^{\#}$ are sensul unei entalpii libere de activare din teoria absolută a vitezelor de reacţie a lui Eyring.

Pentru interacţia $R+L_i \leftrightarrow C_i^*$, gradul de transformare al receptorului R_i în forma biologică activă C_i^* depinde de concentraţia efectorului L_i după o ecuaţie de tip:

$$\Theta_i = \frac{[L_i]}{[L_i]+K_i} \tag{3}$$

În cazul interacţiilor cu caracter cooperaţional, combinarea lui R cu mai multe (n>1) molecule L_i:

$$R+nL_i \leftrightarrow C_i^*; \qquad K_i^n = \frac{[R][L_i]^n}{[C_i^*]}; \qquad \Theta_i = \frac{[L_i]^n}{[L_i]^n + K_i^n} \tag{4}$$

Scanned with OKEN Scanner

Pentru un caracter cooperaţional marcat (n>>1), variaţia lui Θ_i cu $[L_i]$ ia forma unei trepte (totul sau nimic) (**vezi figura 1).**

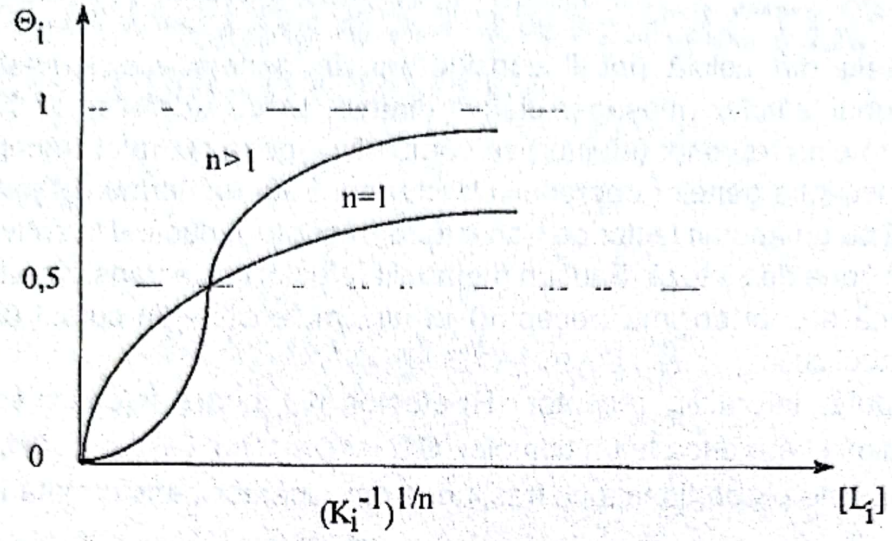


Figura 1

În general:

$$\Theta_i = 0{,}5 \text{ pentru } [L_i] = K_i = e^{-\Delta G_i/nRT} \qquad (5)$$

Cu cât afinitatea ΔG_i a lui L_i pentru R_i este mai mare, cu atât concentraţia $[L_i]$ pentru care se atinge o transformare semnificativă ($\Theta_i \geq 0{,}5$) a lui R în C_i^* este mai mică.

Definirea specificităţii de interacţie

Specificitatea interacţiilor biologice se referă la faptul că dintr-un număr mare (N) de molecule L_j (în general de masă moleculară similară cu efectorul L_i) existente în celulă, în sistemul biologic, numai efectorul corect L_i se combină cu receptorul. Sau, un efector L_i se combină numai cu un anumit receptor R_i, nu şi cu alţi receptori, R_j, din mediul biologic.

Specificitatea diferitelor interacţii biologice nu este absolută. De exemplu, o anumită enzimă, pe lângă catalizarea transformării substratului ei natural, L_i, va cataliza, cu viteză redusă, transformarea unei molecule similare. Multe antibiotice sunt inhibitori competitivi pentru unele enzime bacteriene: sunt similare cu substratul natural, se combină cu enzima pe care o blochează, neputând fi transformaţi mai departe. Mutaţiile punctiforme apar în urma încorporării, în replicarea DNA, a unui nucleotid cu bază falsă, necomplementară bazei corespunzătoare de pe lanţul DNA matriţă.

Scanned with OKEN Scanner

Conform ecuaţiei (5), specificitatea se bazează pe o afinitate, ΔG_i, mai mare a efectorului corect L_i, pentru receptorul R_i, decât a celorlalte N molecule L_j (similare ca M cu L_i) din sistem (ΔG_{ij}). Conform ecuaţiei (6), pentru interacţia necooperaţională, n=1, pentru o funcţionare corectă a proceselor biologice trebuie ca numai formarea complexului corect, $R_i+L_i \leftrightarrow C_i^*$ să aibă loc, nu (sau numai în mică măsură) formarea de complexe false, $R_i+L_j \leftrightarrow C_{ij}$, adică:

$$[L_i] >> e^{-\Delta G_{ii}/RT}; [L_j] << e^{-\Delta G_{ij}/RT}, \text{ pentru } j = 1, 2, ..., N \text{ şi } j = i \quad (6)$$

caz în care probabilitatea de eroare (fracţiunea de complecşi falşi C_{ij}) este mică. În caz că n>>1, condiţia (6) se păstrează şi probabilitatea de eroare devine practic nulă. Diferenţele între afinitatea corectă, ΔG_i (pentru R_i+L_i) şi cele false, ΔG_{ij} (pentru R_i+L_j) trebuie să fie cu atât mai mare cu cât concentraţiile „falşilor efectori", L_j, sunt mai mari în raport cu cea a lui L_i şi cu cât numărul N al „falşilor efectori", prezenţi în sistemul biologic, este mai mare.

Specificitatea şi mărimea situsului de combinare

Specificitatea reclamă şi *situsuri de combinare* (regiunile în contact între L_i şi R_i) suficient de mari. Situsul de combinare al lui R_i trebuie să fie suficient de mare pentru ca să fie mică probabilitatea ca, întâmplător, situsul lui R_i să „palpeze" pe o moleculă L_j (falsă) o constelaţie atomică identică cu situsul de combinare al efectorului L_i. De exemplu, în recunoaşterea drept „străin" a unui fragment de RNA, de către un DNA anumit, lungimea minimă, n, a fragmentului RNA se calculează în modul următor. În general, lungimea N în nucleotide a lanţului DNA este mult mai mare decât lungimea n a fragmentului RNA. Numărul de secvenţe de lungime n (cu acoperire) pe DNA este N-n≅N. Probabilitatea ca o secvenţă de lungime n de pe DNA să fie complementară cu fragmentul RNA este $p=4^{-n}$ (patru tipuri de baze). Trebuie astfel ca [3] :

$$1 - (1 - p)^N \equiv Np = N \times 4^{-n} << 1 \quad \text{sau } n > \lg N/\lg 4 \quad (7)$$

Receptorii, adesea şi efectorii, sunt polimeri sau oligomeri formaţi din α tipuri de monomeri. De exemplu, pentru acizii nucleici, α=4, pentru proteine, α=20 (tipuri de aminoacizi naturali). Formula (7) devine astfel:

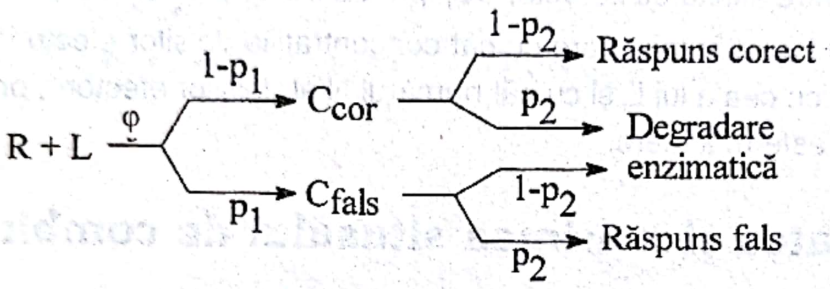
$$n > \lg N/\lg \alpha \quad (7a)$$

Afinitatea receptor-efector este o problemă de potrivire sterică şi din punctul de vedere al forţelor intermoleculare între situsurile de combinare ale celor doi parte-

Scanned with OKEN Scanner

neri. Afinitatea maximă se obţine în cazul unor structuri *„complementare"* – potrivire sterică „cheie şi lacăt", plus juxtapunerea zonelor hidrofobe ale celor doi parteneri, iar în cazul atomilor (grupelor) cu sarcină electrică marcată (respectiv caracter donor sau acceptor de H^+ în punţi de hidrogen) – juxtapunere de atomi de semn contrar. De asemenea, efectorul „ideal" (complementar cu receptorul) trebuie să sufere o cât mai mică reducere a libertăţii de mişcare internă la combinarea cu receptorul. Menţionăm că situsul de combinare al receptorului se referă la receptorul în conformaţia sa biologic activă care adesea nu este conformaţia de cea mai joasă energie.

Un fenomen întâlnit în creşterea fiabilităţii sistemelor biologice este cel al selecţiei în etape – *reglaj în cascadă* sau *kinetic proofreading* [4]. Schema unei asemenea selecţii în etape este dată în figura de mai jos:



Complexele R_iL_i – corecte, C_{corect} şi cele false R_iL_j, C_{fals} – înainte de a da naştere unui răspuns biologic corect, respectiv fals, sunt supuse unui „control", complexele false fiind degradate enzimatic. Ambele procese, atât formarea complexului, cât şi controlul au o probabilitate de eroare (p_1, respectiv p_2). În urma secvenţei celor două procese, probabilitatea unui răspuns fals este egală cu produsul p_1xp_2 al probabilităţilor de eroare separate. De exemplu, la replicarea DNA, pentru fiecare nucleotid nou încorporat, noua pereche este „verificată" şi, dacă cele două baze nu sunt complementare, nucleotidul de pe lanţul în creştere este excizat (pe baza „palpării" bazei de pe lanţul matriţă).

Transcripţia şi replicarea DNA ca exemple

Precizia necesară la *replicare* se poate deduce din considerentul că genomul progenitură trebuie să fie identic, în majoritatea cazurilor, cu genomul părinte (în peste 50% din replicări). Lungimea genomului la *E. coli* este de $N=4x10^6$ bp, iar la mamifere $N=3x10^9$ bp (per genom haploid). Astfel, per bp nou încorporată, la bacterii este necesară $p_{er} \leq 10^{-7}$, iar la mamifere $p_{er} \leq 10^{-10}$.

Monomerii ($\alpha=4$) dATP, dCTP, dGTP, dTTP se găsesc în concentraţii aproximativ egale în celulă. Conform teoriei vitezelor absolute de reacţie a lui Eyring pentru viteza v_{cor} a încorporării nucleotidului cu baza complementară bazei

Scanned with OKEN Scanner

din poziția în cauză a lanțului matriță și pentru viteza v_{fals} a încorporării unui nucleotid cu bază falsă, vom avea (vezi și [5]):

$$v_{cor} = \frac{kT}{h}\exp\left(-\Delta G^{\#}_{cor} / RT\right)\cdot[L_{cor}]$$

$$v_{fals} = \frac{kT}{h}\exp\left(-\Delta G^{\#}_{fals} / RT\right)\cdot[L_{fals}]$$

Luând $[L_{cor}]\cong[L_{fals}]$:

$$p_{er} = \frac{v_{fals}}{v_{cor}} \cong \frac{3\exp\left(-\Delta G^{\#}_{fals} / RT\right)}{\exp\left(-\Delta G^{\#}_{cor} / RT\right)} \Rightarrow \Delta G^{\#}_{cor} - \Delta G^{\#}_{fals} \cong 2{,}3RT\lg\frac{p_{er}}{3} \qquad (8)$$

Cu $p_{er}=10^{-7}$ pentru bacterii, respectiv $p_{er}=10^{-10}$ pentru mamifere:

$$\Delta G^{\#}_{cor} - \Delta G^{\#}_{fals} = -10 \text{ kcal/mol, respectiv } -15 \text{ Kcal/mol} \qquad (9)$$

Aici, afinitatea $\Delta G = -\Delta G^{\#}$ (cu cât energia de activare E este mai mică, cu atât reacția este mai rapidă).

Precizia necesară la *transcripție* – proteina codificată trebuie să aibă, majoritar, structura primară corectă (nici un rest aminoacidic fals). Lungimea genei de sinteză este $N\cong10^3$-10^4 bp (330...3300 resturi aminoacidice, M≅40...400 kDa). Pentru încorporarea fiecărui nucleotid în mRNA este necesară $p_{er}\leq10^{-4}$ și conform ecuației (8):

$$\Delta G^{\#}_{cor} - \Delta G^{\#}_{fals} \cong -6 \text{ kcal/mol} \qquad (9a)$$

Mecanismele moleculare care asigură o diferență $\Delta G^{\#}_{cor} - \Delta G^{\#}_{fals}$ destul de mare ar fi:

a) Constanța distanței interlanț reclamă, pentru evitarea unor tensiuni sterice, împerecherea unei baze purinice (mai mare) cu o bază pirimidinică (mai mică);

b) Împerecherile incorecte GT (GU), TG (UG), AC și CA formează un număr mai mic de punți de hidrogen decât cele corecte (GC, CG, TA, AT).

În perechea TA avem două punți de hidrogen, în CG – trei punți de hidrogen (vezi figura 2).

În TG avem o punte de hidrogen și o juxtapunere de grupe donoare de H^+; considerând contribuția punților de hidrogen la entropia perechilor de baze deja fixate, $\Delta S\approx0$, rămâne numai contribuția $\Delta H\cong -5$ kcal/mol per punte. Am avea $\Delta G(TA) - \Delta G(TG) \cong \Delta H$ (punte de hidrogen) + ΔH (juxtapunere de două grupe cu sarcină pozitivă) ≅ 10 kcal/mol. Pentru perechea TG (enol) avem însă trei punți de hidrogen

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

TA: CG:

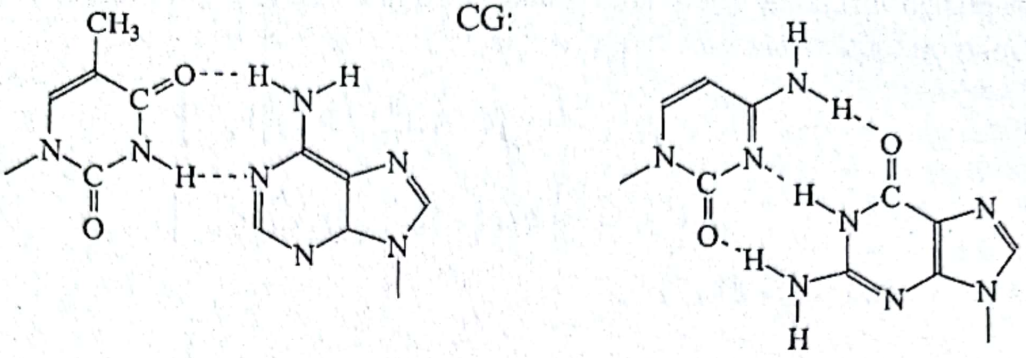
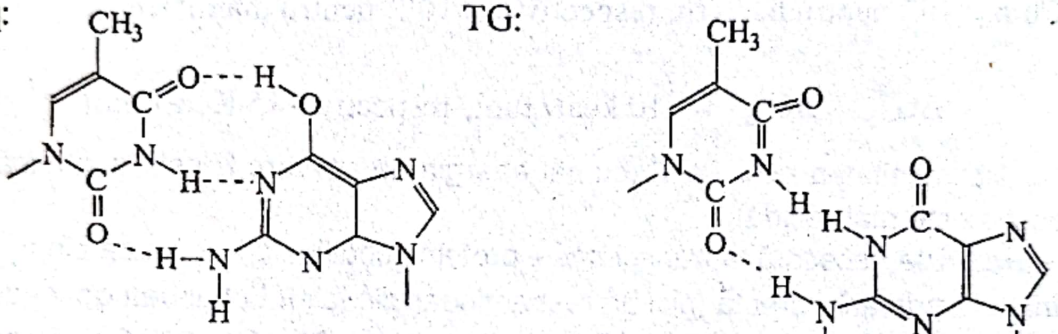


Figura 2

și pierderea de energie (afinitate) se poate pune numai pe seama trecerii guaninei din izomerul ceto în cel enolic, pentru care măsurătorile experimentale dau $\Delta G \cong 3$ kcal/mol (vezi figura 3).

TG_{enol}: TG:



CA:

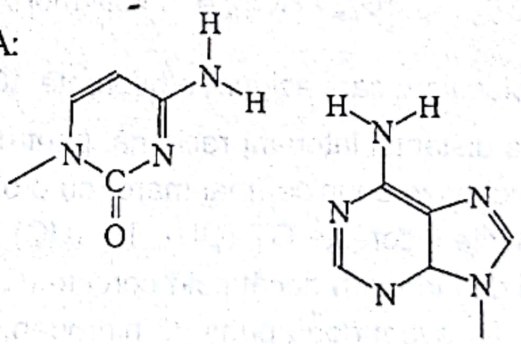


Figura 3

La replicare, probabil și la transcripție, pe lângă împerecherea bazelor, enzima „citește" și grupele perechii de baze din șanțul mare: AT (N, NH_2, O, CH_3); TA (CH_3, O, NH_2, N); CG (H, NH_2, O, N); GC (N, O, NH_2, H). Perechea falsă TG (enol) are în șanțul mare (CH_3, O, HO, N) față de perechea TA (CH_3, O, NH_2, N); în șanțul mare,

HO prezintă o pereche de electroni neparticipanți, sarcina -δ, pe când NH_2 prezintă atomul H, cu sarcina +δ, a unei legături NH[6].

În afară de aceasta, la replicare urmează corecția erorilor (proof-reading), prin care o enzimă „citește" și elimină, de pe lanțul nou format, nucleotidul cu baza falsă [7].

Sisteme cu grad înalt de specificitate [8]

Există sisteme cum ar fi cel al interacției represor-operator în reglajul transcripției la bacterii, sau interacția anticorp-antigen, când receptorul trebuie să recunoască un ligand corect, L_0, aflat uneori la o concentrație c_0 -mică-, între un număr mare, N, de liganzi falși, L_j – la concentrații c_j – uneori mari. De exemplu, un anticorp, R, trebuie să recunoască un antigen bacterian, dar nici unul din antigenii (determinanții antigenici) corespunzători structurilor propriului organism. Avem astfel echilibrele:

$$R + L_0 \leftrightarrow C_0 \text{ (corect)}; \; R + L_j \leftrightarrow C_j \text{ (fals)}; \; j = 1,2,\ldots,N \qquad (10)$$

Probabilitatea de eroare – de recunoaștere falsă, p_{er}, va fi raportul dintre concentrația $\Sigma [C_j]$ a complecșilor falși per cea totală (în care predomină complexul corect C_0). Dacă notăm prin ΔG_0 afinitatea lui R pentru L_0 și prin $\Delta \overline{G}_f$ o afinitate medie a lui R pentru liganzii falși, L_j, vom avea:

$$p_{er} = \frac{\Sigma[C_j]}{[C_0]+\Sigma[C_j]} \cong \frac{\Sigma c_j \exp(\Delta \overline{G}_f / RT)}{c_0 \exp(\Delta G_0 / RT)} << 1 \qquad (11)$$

Diferența între afinitatea pentru partenerul L_0 corect și cea medie, pentru partenerii falși, trebuie astfel să fie:

$$\Delta G_0 - \Delta \overline{G}_f \geq 2,3RT \lg \frac{\Sigma c_j}{c_0 p_{er}} \qquad (12)$$

Liganzii L_0 și L_j sunt adesea oligopeptide. Dacă L_0 este „complementar" cu situsul receptorului R, scăderea afinității la L_j va apărea prin substituții aminoacide în L_j, în raport cu L_0. Dacă diferența de afinitate, $\Delta G_0 - \Delta \overline{G}_f$, cerută de precizia procesului de recunoaștere, este mare, o singură substituție (în raport cu L_0) nu va scădea, de regulă, în suficientă măsură, afinitatea. Dacă o substituție scade, în medie, cu $\Delta \overline{g}$ afinitatea (în raport cu cea a perechii R-L_0), numărul (mediu), ν, de substituții necesar unei scăderi suficiente a afinității, va fi:

$$\nu = \frac{\Delta G_0 - \Delta \overline{G}_f}{\Delta \overline{g}} \qquad (13)$$

Scanned with OKEN Scanner

De exemplu, în interacţia dintre un receptor proteic şi liganzi oligopeptidici, o substituţie aminoacidică (în raport cu L_0) scade, în medie, afinitatea cu $\Delta\bar{g} \cong 2 - 3$ kcal/mol [9].

Cu aceste date se poate evalua mărimea situsului de combinare, necesar pentru a asigura discernarea ligandului corect dintre N liganzi falşi, în condiţiile de concentraţii descrise. Liganzii (L_0, L_j) sunt polimeri formaţi din α tipuri de resturi monomere (α=20 pentru peptide), deci situsul de combinare trebuie să cuprindă (să intre în contact cu) n asemenea resturi monomere. Numărul total de n-meri, din α tipuri de monomeri este α^n. Numărul de n-meri care diferă prin cel puţin ν substituţii de n-merul corespunzător lui L_0 este, aşa cum se poate arăta prin analiza combinatorie, $\alpha^{n-\nu+1}/C_n^{n-\nu+1}$. Acest număr trebuie să fie mare în raport cu numărul N (mai exact, N+1) de liganzi, dintre care receptorul trebuie să-l recunoască pe cel corect. Prin calcule aproximative se ajunge în final, pentru mărimea (numărul) de n monomeri a situsului de combinare, la:

$$n > \nu + 1 + \frac{\lg N + (\nu - 1)\lg[n/(\nu - 1)]}{\lg \alpha} \qquad (14)$$

Evaluarea este, după cum se vede, bazată pe o serie de ipoteze simplificatoare. Între altele, mărimea n ar trebui să cuprindă nu numai resturile monomere din situsul de combinare, ci şi pe cele din alte poziţii, ale căror substituţii modifică, prin efecte indirecte, afinităţile ΔG_{ij}.

Mai amintim că în cazul unei interacţii cooperaţionale a lui R cu mai multe molecule L, formarea complecşilor C_0, C_j capătă un caracter „totul sau nimic", echilibrele (10) pot fi considerate ca reacţii de precipitare având loc dacă este depăşit produsul de solubilitate. Formula (12) poate fi utilizată considerând, separat, interacţia cu fiecare partener fals:

$$\Delta G_0 - \Delta G_j > 2{,}3RT \lg \frac{c_j}{c_0} \qquad (15)$$

Pentru toţi partenerii L_j falşi, condiţia (15) trebuie să fie îndeplinită. Pentru interacţiile antigen-receptor de antigen (BCR, TCR) pare să existe un caracter cooperaţional marcat al interacţiei, formula (15) şi nu formula (12) fiind recomandabilă pentru calcule de diferenţe de afinitate.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Referinţe generale: a). Dean D. M. (1987) *Molecular Foundations of Drug-Receptor Interactions,* Cambridge Univ. Press, London; b). Hollenberg M. D. (1990) Structure activity relationship from the receptor point of wiew. *J. Med Chem,* **33:** 1275; c). Simon Z. (1973)

Scanned with OKEN Scanner

Biochimie Cuantică și interacții specifice. Edit. Științifică, București, în special cap. 6.
2. Vezi [1c], paragr. 1.4.
3. Thomas Jr. C. A. (1966) Oligonucleotde size and specificity in DNA–RNA hybridization. *Progr Nucl Acid Res Mol Biol*, **5:**315.
4. a). Scherer K. (1968) Messenger RNA pattern in animal cells and the concept of cascade regulation. *Abh Dtsch Akad Wiss Berlin Klin Mediz*, **1:**259; b). Hopfield J. J. (1974) Kinetic proofreading: A new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **71:**4135; c). vezi [1c], paragr. 6. 5.
5. Volkenstein M. D., Eliashevici A. M. (1961) About the theory of mutations. *Dokl Akad Nauk SSSR (Moscova)*, **136:** 1216.
6. Kubitscheck H. E., Henderson T. R. (1966) DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, **55:**512.
7. Radman M., Wagner R. (1988) The high fidelity of DNA replication. *Sci Amer*, **8:**24.
8. Vezi [1c], cap. 6; paragr. 1 și 4 și Anexe 4 și 5.
9. Vezi Simon Z., Gheție V. (1971) *Rev Roum Biochimie*, **8:**26 – analiză a datelor din Spragg J et al (1969) *Biochemistry*, **7:**4086; Schaechter J (1970) *Nature*, **228:**639; Parker C. W. (1966), *Biochemistry*, **5:**2314.

Scanned with OKEN Scanner

REGLAJUL GENELOR LA EUCARIOTE

Z. SIMON

Genomul la eucariote şi la procariote: comparaţii

Controlul activităţii genelor – prima cascadă de amplificare din schema dogmei centrale – este cel mai eficient, dar şi cel mai lent mod de reglare al activităţii sintetice a celulei.

La procariote – bacterii *(E. coli)* – lungimea tipică a cromozomului bacterian este de 4 x 10^6 perechi de baze (bp) care codifică aproape integral proteine, corespunzând la circa 4000 gene de sinteză (GS) ce codifică 4000 de tipuri de proteine (enzime), cu o masă moleculară medie de 40 kDa. Reglajul activităţii genice este preponderent (dar nu numai) negativ, conform schemei Jacob-Monod (vezi figura 1).

Genele GS_1, GS_2..., GS_n aparţinând unei căi metabolice sunt grupate într-un operon şi reglate solidar prin gena operator GO de către proteina represor R, codificată de gena represor GR (ce face parte şi ea dintr-un operon). Enzimele (codificate E_1, E_2,..., E_n) transformă un substrat S într-un produs P necesar metabolismului bacterian. De regulă, P inactivează represorul R, substratul S îl activează, asigurându-se o reglare a activităţii operonului în funcţie de necesităţi ale metabolismului [2].

Celulele eucariote, în special cele din organismele superioare, au funcţii mult mai variate de executat. La acelaşi, sau aproximativ acelaşi genom – în celulele diverselor ţesuturi sunt active grupe diferite de gene. La om, genomul haploid are o lungime de circa $3x10^9$ bp, din care numai aproximativ 3%, adică circa $1x10^8$ bp codifică proteine – corespunzând la circa 100 000 gene structurale şi tot atâtea tipuri de proteine (pentru o masă moleculară medie de 40 kDa).

Reglajul este aici preponderent pozitiv. Cromozomii conţin proteine bazice (histone) având o structură condensată sau supracondensată, starea „normală" a genelor fiind cea „stinsă" (inactive transcriptional) – spre deosebire de situaţia de la bacterii. Activarea genelor implică, în primul rând, o trecere la o stare mai puţin condensată, care permite spaţial accesul factorilor de transcriere la gene. Această

Scanned with OKEN Scanner

decondensare spațială se realizează de către „factori de transcriere arhitecturali", proteine cu grad redus de specificitate, în sensul că decondensează grupe mari de gene. În al doilea rând este necesară intervenția unor proteine activatoare, înalt specifice, asupra unor secvențe nucleotidice de tip promotor și enhancer, care stimulează transcripția. Câteva secvențe activatoare (receptori pentru proteine activatoare) preced, de regulă, o genă de sinteză GS și formează o unitate din punct de vedere al reglării activității GS. Activarea implică anumite modificări mecanice (tipul de pliere al elicei duble DNA), care permit legarea multiplilor factori de transcripție care efectuează transcripția propriu-zisă [3].

Menționăm că, în raport cu lanțul DNA transcris, direcția 5'–3' se consideră „downstream" (în jos) și corespunde numerotării crescătoare a nucleotidelor, iar direcția 3'–5', „upstream" (în sus). La numerotarea nucleotidelor din lanțul transcris, în sens downstream crește numerotarea, în timp ce în sens upstream nucleotidele primesc numere negative.

Ca mărime, unul dintre cele mai mici genomuri bacteriene cunoscute, cel de la *Mycoplasma genitalium,* are $5,8x10^5$ bp – în total 482 de gene. Dintre acestea, 90 de proteine sunt implicate în mașinăria translațională, 30 de proteine pentru replicarea DNA iar 140 de gene codifică proteine inserate membranar. Cinci gene sunt implicate în funcții reglatoare, 22 de gene sunt implicate în mecanismul de evaziune de la răspunsul imun al gazdei iar 117 au funcții necunoscute. Dintre cele mai mici genomuri eucariote, cel de la *Saccharomyces cerevisiae* are $12,5x10^6$ bp. Genomul uman este și el în curs de secvențializare, lucrând un număr mare de grupuri de cercetători, în general pe diferiți cromozomi, pe bază de secvențe DNA complementare parțiale (Expressed Sequence Tags, ESTs) și secvențe de consens (THC). Din genele umane identificate, 40% sunt asociate cu metabolismul, cu structurile celulare de bază și cu diviziunea celulară, 22% cu sinteza și procesarea proteinelor și a DNA, 12% cu semnalizarea intracelulară.

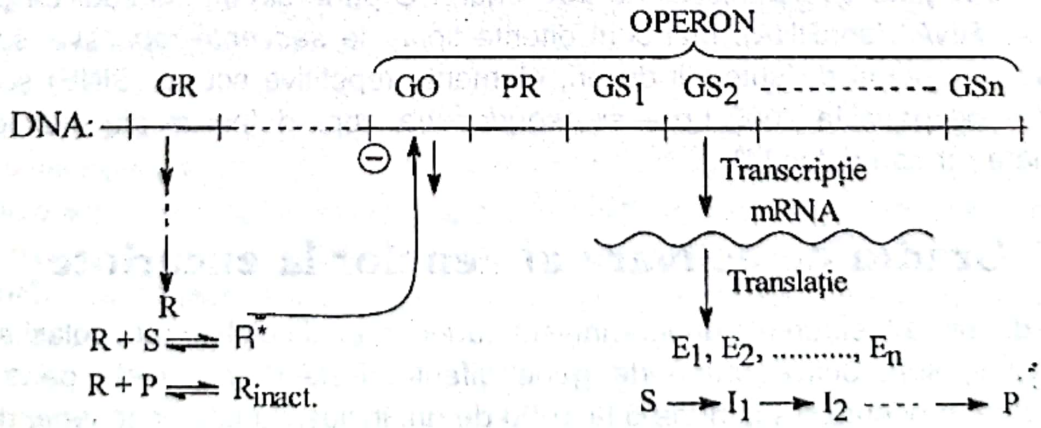


Figura 1

Scanned with OKEN Scanner

Structura cromatinei

Genele vertebratelor au, în medie, o lungime de 50 kbp, ajungând uneori şi la 200 kbp sau chiar peste 1 Mbp (gena pentru distrofină). Aşa cum se poate vedea la microscop, genele active se află în eucromatină, cele inactive în heterocromatină. Anterior, numărul total de GS în genomul de mamifer l-am evaluat la 100 000, de circa 25 de ori mai multe decât în *E. coli.*

Structura de bază a cromatinei o constituie nucleozomii, organizaţi în şirag de perle. *Nucleozomul* este un octamer histonic – câte două molecule de histone H2A, H2B, H3 şi H4, peste care este înfăşurată o porţiune de elice dublă de DNA de circa 150 bp, formând 1,8 spire. Între nucleozomi, elicea dublă de DNA continuă cu o porţiune de circa 40 bp asamblată cu histona H1, aşa-numitul *linker nucleozomal.* Nucleozomii ataşaţi prin linkeri formează *şiragul de perle.* Şiragul de perle este la rândul său spiralat într-o superfibră cu diametrul $\phi \cong 250 \div 300$ Å, aşa-zisul *solenoid,* în general de circa 45 kbp DNA, cu 6 ÷ 9 nucleozomi şi circa 1200 bp DNA per spiră. Solenoidul este pliat adiţional în *meandre* (loops) conţinând circa 35 ÷ 90 kbp, în special în nucleii în interfază şi cromozomii la metafază. Aceste meandre se pare că servesc la ancorarea la structurile de suport în nucleu (nuclear matrix, scaffold) [2].

Cromozomii, se presupune că se organizează în unităţi funcţionale autonome care delimitează niveluri şi tipuri de expresie ale genelor. Aceste unităţi au la bază secvenţe DNA cu rol de receptori pentru matricea nucleară (MAR), care permit suprastructurarea cromozomilor şi delimitează structural meandre (loops) ale cromatinei şi pentru proteinele izolator (insulator), care izolează, din punct de vedere al controlului transcrierii, gene sau grupe de gene[3].

În ceea ce priveşte cele 97 de procente de DNA noncodant („junk DNA"), o parte intră în compoziţia intronilor (în interiorul GS), a secvenţelor receptor pentru proteinele reglator şi complecşii de transcriere. O parte din introni codifică „small nucleolar RNA" (snoRNA). Mai sunt diferite tipuri de *secvenţe repetitive,* sateliţi, minisateliţi repetaţi de sute-mii de ori, elemente repetitive scurte (SINE) şi lungi (LINE) – de până la 7000 bp – şi *pseudogene,* copii defective ale unor gene, exprimate rar sau deloc [4].

Gradul de activare al genelor la eucariote

În diferitele ţesuturi ale unui organism superior, deşi celulele au acelaşi set de cromozomi, sunt active grupe de gene diferite. Este drept, unele gene sunt amplificate în diferite ţesuturi, de 5 la 1000 de ori, inclusiv unele oncogene, dar nu acesta este principalul mecanism de diferenţiere. De exemplu, în eritrocite, genele pentru polipeptidele hemoglobinei nu sunt amplificate. În ceea ce priveşte tipurile

Scanned with OKEN Scanner

de gene, o clasificare încercată pe baze funcţionale, distinge gene implicate în mitoză *(mitotic genes)*, gene pentru metabolismul de bază al celulei *(house-keeping genes)* şi gene *histospecifice* [5]. Din cele maximum 10^5 gene (10^4 ar fi poate o evaluare mai realistă) circa 1000 de gene (1% din genomul de mamifere) par să codifice protein-kinaze, proteine specifice cu rol reglator, implicate în transmiterea în interiorul celulei a semnalelor declanşate de mesagerii chimici extracelulari.

În ceea ce priveşte gradul de activare a diferitelor gene, măsurători ale vitezei relative de sinteză a colagenului (pe baza încorporării de hidroxiprolină) la 22 de tipuri de culturi celulare indică o distribuţie în trei domenii a acestei viteze relative [6], anume: a) 1,5 ÷ 14% din viteza totală de sinteză a proteinelor, în culturi de fibroblaşti diploizi; b) 0,15 ÷ 0,4%, în linii stabilizate de culturi de origine nonfibroblastică (HeLa, KB) şi c) sub limitele de detecţie – limfocite, leucocite. În cazul colagenului (o proteină stabilă care nu este degradată intracelular) această viteză relativă de sinteză reflectă, probabil, gradul de activare al GS pentru colagen. Datele ar sugera trei grade de activare posibile ale GS în eucariote, intervalele 1,5 ÷ 14% şi 0,15 ÷ 0,4% fiind date de viteza integrală de transcripţie (numărul de gene active) în celulele respective.

O concluzie similară privind existenţa a trei grade de activare posibile ale GS în celulele de pluricelulare rezultă şi din studiile de hibridizare/competiţie DNA-mRNA efectuate de Bishop *et al* [7]. Se procedează astfel: DNA integral din genomul organismului respectiv (eliberat din cromatină) este transcris de un complex enzimatic bacterian, în mediu cu nucleotide marcate, rezultând mRNA-total, marcat şi hibridizat cu lanţul DNA transcris. Acest hibrid radioactiv se suspendă într-un mediu cu exces de mRNA extras dintr-un ţesut al aceluiaşi organism. Din cinetica deslocuirii mRNA marcat din hibrid de către mRNA nemarcat, extras din ţesut, se poate deduce numărul de tipuri de mRNA şi concentraţia relativă a acestora, în mRNA extras din ţesut. Rezultatele indică trei clase de abundenţă în mRNA extras din diferite ţesuturi:

a) *low copy abundance class* – 0,01 ÷ 15 molecule de mRNA per celulă şi foarte multe tipuri de secvenţe, 33000 în HeLa, poate chiar 10^6 secvenţe în anumite culturi celulare;

b) *moderately prevalent class* – 10 ÷ 300 molecule per celulă şi între 370 şi 10^4 tipuri de secvenţe de mRNA;

c) *supervalent class* – $10^3 \div 10^4$ molecule per celulă şi 17 ÷ 400 tipuri de secvenţe.

Prima clasă de abundenţă ar putea cuprinde toate genele inactive, care reprezintă majoritatea genelor din genom. Ele sunt transcrise, probabil accidental, în cursul replicării DNA; cromatina este în mod necesar despiralizată (accesibilă complexului de transcriere) în zona furcii de replicare. Celelalte două clase ar putea reflecta celelalte două grade de activitate posibile pentru GS – slab (moderat) active şi total active – GS transcrise cu viteza maximă permisă de precursorii existenţi şi complexul de transcriere.

Scanned with OKEN Scanner

În ceea ce privește clasa de abundență scăzută, într-un studiu asupra a patru transcripți mRNA specifici pentru patru tipuri de celule investigate, cantități mici din toți (3) transcripții nespecifici s-au găsit în toate tipurile de celule investigate. Această transcriere accidentală a genelor inactive, probabil în cursul replicării DNA, poate fi pusă în legătură cu așa-numita mitoză cvantală [9], cu un presupus rol cheie în diferențierea celulară.

O serie de cercetări, bazate pe revers-transcripția mRNA celular în cDNA și tăiere prin endonucleaze de restricție la secvențele nonanucleotidice de la capătul 3' – metoda SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) promit inventarierea tipurilor din mRNA (gene transcrise) dintr-un tip celular (țesut). De asemenea, electroforeza bidimensională, cuplată cu tehnici de spectrometrie de masă permite, inventarierea tipurilor și a abundenței diferitelor proteine dintr-un țesut, așa-numitul proteom [10].

Structura cromatinei și activarea cromozomilor

Gena mamiferelor, inclusiv secvențele de control situate upstream, cu o lungime medie de 50 000 bp, se întinde peste un număr mare de nucleozomi care, împreună cu regiunea linker, implică circa 200 bp DNA per nucleozom. Structura supraspiralată a cromatinei împiedică accesul proteinelor activatoare și a complexului de transcriere la genă. Structura DNA în nucleozom pare să permită un acces parțial, activarea genelor implicând, între altele, și o disociere parțială a structurii nucleozomale [11].

În cursul replicării DNA, structura supraspiralată și cea nucleozomală este, în mod forțat, desfăcută în zona furcii de replicare. S-a pus problema dacă structura activă/inactivă a genei și a cromatinei din zona respectivă se pot moșteni în cursul replicării. Studii asupra unei gene rRNA transcripțional active, la *Saccharomyces cerevisiae,* în cursul replicării, au arătat că nu. În lipsa unor factori proteici specifici rezultă, în spatele furcii de replicare, o pereche de structuri cromozomale inactive. Includerea de proteine activatoare specifice în cursul formării cromatinei duce însă la o structură mai „deschisă", accesibilă mașinăriei de transcriere [12].

Poziționarea specifică și disrupția parțială a nucleozomilor, care permit accesul mașinăriei transcripționale – activarea genei, implică acetilarea grupărilor NH_2 a histonelor (repulsie față de fosfatul din DNA), consum de ATP și intervenția unor proteine. O poziționare potrivită poate, de exemplu, să aducă pe aceeași suprafață a nucleozomului, două elemente reglatoare DNA separate prin 80 bp – un tur pe nucleozom. Proteinele care induc structura activă a cromatinei se mai numesc *factori de transcriere arhitecturali.* Între acestea sunt proteine HMG (High Mobility Group – cu mobilitate mare la electroforeză) la mamifere și un grup de cinci proteine, SW1/SNF la levuri, toate proteine nucleare. Aceste proteine formează

Scanned with OKEN Scanner

complecşi multiproteici, cu o afinitate slabă faţă de DNA şi cu o specificitate slabă (sau deloc) în raport cu secvenţele DNA la care se leagă. În sfârşit, posibilitatea unei proteine activatoare, legată de o secvenţă DNA activatoare (enhancer), de a activa transcrierea a două gene vecine (upstream, respectiv downstream) este condiţionată de interacţia unor proteine Ins-BP sau su-Hw-BP (la *Drosophila*) şi de secvenţe „insulator" de pe DNA, modulând plierea spaţială a elicei duble DNA [13].

Gena eucariotă şi elementele de reglaj ale transcripţiei [14]

Structura genei şi a elementelor de control la eucariote se deosebesc de cele de la procariote, în sensul că o genă de sinteză (GS) este sub controlul mai multor secvenţe DNA tip *enhancer* sau *promotor* (primele situate, în general, upstream faţă de celelalte), ce devin activatoare prin legarea unor proteine stimulatoare specifice, sau de tip *silencer* – care inhibă transcripţia în urma legării altor proteine specifice. Schematic, această unitate de transcripţie este reprezentată în figura 2.

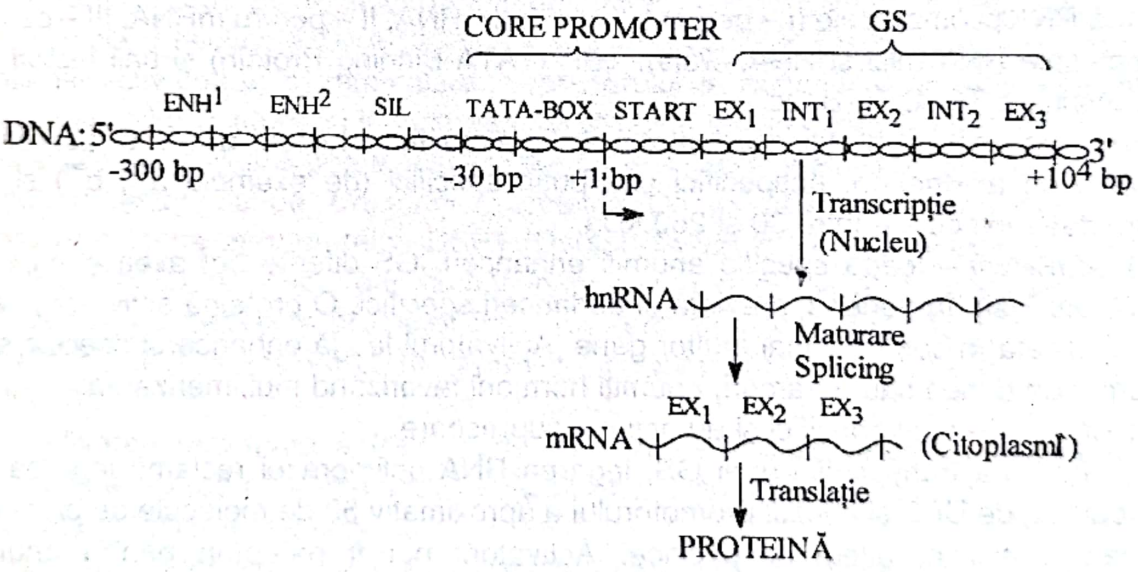


Figura 2

Secvenţele de control ENH şi SIL au lungimi tipice de 8 ÷ 12 bp; se mai numesc „upstream control elements" (UPE), deşi se găsesc secvenţe de control şi în josul „start"-ului. Transcrierea GS duce la formarea hnRNA (heterogenous nuclear RNA) care, printr-un proces de maturare, prin splicing (procesare), prin eliminarea intronilor (INT), duce la mRNA citoplasmatic format numai din exoni şi care, ulterior, va fi translatat într-un polipeptid (proteină).

Scanned with OKEN Scanner

Ca exemple, o genă SV40 (early transcript gene), exprimată timpuriu în ciclul de replicare al virusului, conţine cinci secvenţe DNA (UPE) pentru legarea proteinei Sp1– activatoare a transcripţiei şi o serie de secvenţe B-A-B-A pentru legarea proteinelor A şi B. O genă a virusului MMTV este reglată de GRP (glucocorticoid receptor protein); având trei secvenţe de legare a GRP în jurul poziţiei – 150 bp şi alte două secvenţe de legare a GRP în jurul poziţiei – 300 bp. Genele imunoglobulinelor au cel puţin trei tipuri de secvenţe de control: a) enhancerii E1, E2, E3, E4, care leagă proteine specifice sau nespecifice celulelor B; b) enhancer şi promotor limfoid-specifice şi c) secvenţe intragenice implicate în controlul posttranscripţional. Ca localizare, aceste secvenţe sunt situate în poziţia 5' faţă de regiunea codificatoare dar şi intronic.

Amintim că în afară de GS pentru codificarea proteinelor, alte gene GS specifică precursorii rRNA, cei 20 tRNA şi molecule RNA mici (5S RNA, snRNA).

Factorii de transcripţie este denumirea globală a proteinelor implicate în reglajul şi efectuarea transcripţiei. Pot fi distinse patru clase şi anume:

a) *factori bazali* sau factori de transcripţie nespecifici sau puţin specifici care leagă regiunea „miez" a promotorului (aproape de start, +1) a celor mai multe gene. Legarea se face numai în prezenţa activatorilor şi a coactivatorilor. În această clasă intră RNA polimerazele (I – pentru transcrierea rRNA, II – pentru mRNA, III – pentru molecule RNA mici şi RNA virale), TBP (TATA Binding Protein) şi unii factori de transcriere TF-A, TF-B etc.

b) *coactivatorii* – proteine adaptor, fac legătura între factorii bazali şi activatori. Sunt, de asemenea, nespecifici sau puţin specifici (de exemplu a^{30}, b^{30}) şi au greutăţi moleculare între 30 şi 250 kDa.

c) *activatorii* – leagă specific anumiţi enhanceri. GS diferite pot avea enhanceri comuni însă, în general, prezintă şi enhanceri specifici. O proteină activator poate fi implicată în controlul mai multor gene. Activatorul leagă enhancerul specific sub formă de dimeri sau tetrameri, anumiţi hormoni favorizând multimerizarea.

d) *silenceri* – sunt specifici şi au acţiune supresoare.

Iniţierea transcripţiei unei GS, legarea RNA polimerazei reclamă legarea, în prealabil, de UPE şi miezul promotorului a aproximativ 50 de molecule de proteină, unele specifice, altele nespecifice. Activatorii pot fi receptori pentru anumiţi hormoni; o celulă GH3 conţine circa $3x10^4$ receptori pentru estrogen şi $6x10^4$ receptori pentru progesteron. Legarea factorilor de transcripţie pune o serie de probleme mecano-chimice, plierea elicei duble DNA, contacte între porţiuni de elice pe şi între nucleozomi etc.

Interacţia factorilor de transcriere cu secvenţele de control. Se consideră că inducerea transcrierii implică o pliere a elicei duble DNA astfel că anumiţi factori de transcriere, legaţi de secvenţe DNA diferite, să fie puşi în contact direct, prin intermediul proteinelor activator specifice. De exemplu, conform schemei de mai

Scanned with OKEN Scanner

jos, inducerea transcripţiei DNA implică în primul rând fosforilarea, via anumite protein-kinaze, a activatorului STA. STA-fosforilat leagă coactivatorul CBP, care la rându-i leagă factorii de transcripţie TAF şi TFIIB şi abia acum poate fi recrutată o moleculă de RNA polimerază II, care efectuează transcripţia. Plierea DNA ar putea fi necesară pentru a crea condiţiile sterice de asociere cu RNA polimeraza (vezi figura 3).

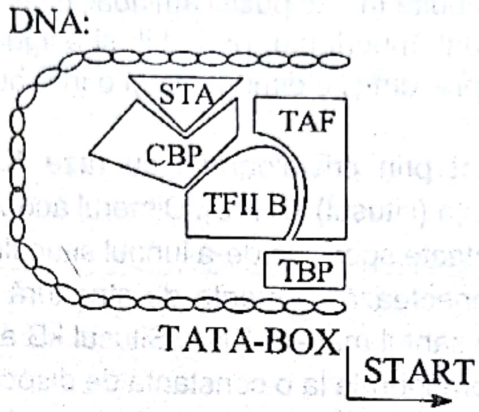


Figura 3

Represia [15] poate fi explicată prin diferite mecanisme: a) legarea unui represor de o secvenţă DNA-SIL şi împiedicarea sterică a legării de enhancer a proteinei activatoare; b) intercalarea represorului în complexul de factori bazali, coactivatori şi activatori, cu inducerea unei structuri spaţiale inactive în transcripţie. Una şi aceeaşi proteină poate activa unele gene şi represa altele, în aceeaşi celulă. Astfel, în embrionii de *Drosophila,* proteina Dorsal activează gena *twist,* dar represează gena *zen;* proteina DSP1 (Dorsal Switch Protein) converteşte Dorsal din activator în represor, dar numai în prezenţa unei secvenţe silencer (SIL), adiacente unei secvenţe promotor (la gena *zen*). Similar, la mamifere, activatorul NF-KB poate fi transformat în represor, în prezenţa unor proteine din clasa HMG[16].

Activarea maximală a transcripţiei unei gene implică prezenţa activatorilor specifici pentru toţi enhancerii GS; în lipsa unor activatori, transcripţia are loc, dar cu o rată de iniţiere mai redusă.

Legarea unor activatori de enhancerii lor a fost studiată prin cristalografie de raze X[17], un exemplu fiind legarea activatorului p53 de enhancerul său de pe gena supresoare tumorală omonimă. Proteina p53, formată din 393 resturi amino-acidice, are trei domenii funcţionale în structura sa primară. Aminoacizii 1–100 NH_2 – terminali sunt implicaţi în activarea transcrierii, regiunea mediană în legarea DNA, iar ultimii 100 aminoacizi COOH– terminali în dimerizarea lui p53. Legarea DNA se face specific la o secvenţă dublă de tip $[Pu\ Pu\ Pu\ C\ (A/T)\ (A/T)\ G\ Py\ Py\ Py]_2$, unde Pu reprezintă purină iar Py – pirimidină. Fiecare din cele două grupe decanucleo-

Scanned with OKEN Scanner

tidice interacţionează direct cu numai câte opt resturi aminoacidice de pe un lanţ polipeptidic al p53 dimerizat. Resturile aminoacidice sunt dispersate de la poziţiile 120 la 283 în structura primară şi aparţin la două grupe structurale diferite: o buclă (loop)-β sheet-helix (LSH) care leagă DNA în şanţul mare şi o buclă (L) care interacţionează cu lanţul mic al DNA. Deşi numai opt resturi aminoacidice per polipeptid sunt implicate direct în legarea la DNA, mutaţiile care inactivează proteina p53 sunt distribuite în 125 poziţii aminoacidice. În afară de legarea propriu-zisă a p53 de DNA sunt importante, probabil, şi asigurarea unei structuri spaţiale adecvate a proteinei, precum şi o dimerizare şi o interacţie corectă cu alţi factori de transcriere.

Un alt caz studiat prin cristalografie cu raze X este legarea activatorului NF-KB x p50 la secvenţa (situsul) kB [18]. Dimerul acoperă o elice DNA tip B nedistorsionată, făcând contacte specifice de-a lungul situsului kB de 10 perechi de baze prin meandre care conectează elemente de structură secundară din ambele domenii cu elemente din şanţul mare al DNA. Situsul kB are o structură palindromică. Afinitatea de legare corespunde la o constantă de disociere în domeniul $K \cong 10^{-12}M$, faţă de domeniul uzual $K \cong 10^{-9}M$. Factorul de transcriere NF-KB este un element cheie pentru ajustarea rapidă a programului transcripţional la condiţii variabile.

Reglajul transcrierii implică o serie de interacţii complexe cu proteine corepresor şi coactivator [19]. De exemplu, în cazul reglajului prin proteina receptor de acid retinoic (RAR) şi RXR (Retinoid X Repressors), heterodimerul RXR x RAR leagă 5' – 3' pe secvenţa DNA-DR5 (direct repeats, separate prin 5 bp). Corepresorul (CoR) leagă un situs de pe RAR însă, în prezenţa acidului retinoic *all-trans* (atRA), poate fi deplasat de activator (CoAct + atRA), ceea ce duce la activarea genei. Heterodimerul cu altă ordine spaţială RAR x RXR legat 5' – 3' pe altă secvenţă promotor DNA, anume DR1 (direct repeats, separate de 1bp) cu CoR legat tot de RAR, fixează CoAct + atRA la alt situs al RAR, ducând la o stare inactivă a genei.

Reglajul activităţii genelor şi diferenţierea celulelor eucariote [20]

Existenţa aceluiaşi genom în mai multe ţesuturi implică activarea stabilă (peste mai multe cicluri de diviziune celulară) a anumitor grupe de gene şi posibilitatea de stingere/aprindere specifică a unor gene, sub influenţa unor factori precum hormoni sau organizatori embrionari.

Baza menţinerii activării stabile ar putea fi gena autoreglată a lui Ptashne [21]. Gena autoreglată îşi sintetizează propria proteină activator, Act, care leagă specific

Scanned with OKEN Scanner

un enhancer (ENH) al genei. Chiar trecerea furcii de replicare peste GS nu duce la inactivare, Act din interiorul celulei (nucleului) refixând ENH după trecerea furcii. Act activează transcripţia propriului mRNA. În prezenţa, temporară, a unui factor dezactivant al lui Act, după un timp (ore-zile), acesta este degradat sub acţiunea proteazelor celulare iar gena se stinge. Acelaşi Act poate controla activitatea şi a altor gene care au acelaşi ENH (vezi figura 4).

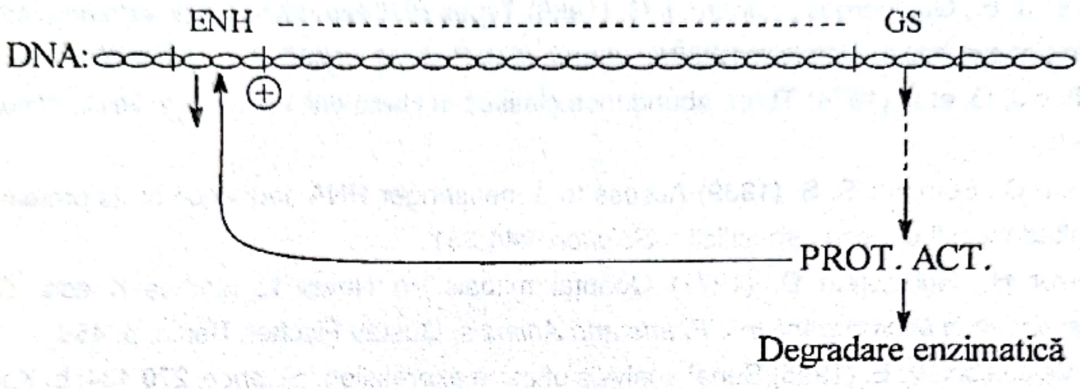


Figura 4

Aprinderea unor gene ar putea implica, în primul rând, factori de transcriere arhitecturali care să favorizeze „afânarea" structurii cromozomiale. De asemenea, aşa-numita diviziune cvantală [9] permite, o dată cu desupraspiralizarea cromozomului în zona furcii de replicare, transcripţia unui număr mic de molecule de proteină Act de pe gene stinse. Factori temporari, care stabilizează, specific, moleculele de activator şi/sau le măresc afinitatea pentru ENH specific, ar putea duce la activarea transcripţiei, creşterea concentraţiei intracelulare de Act – comutarea GS la starea activă.

Lucrurile sunt, desigur, mai complicate, o GS fiind controlată, *via* secvenţe ENH diferite, de mai multe proteine Act. Grupe de gene GS care îşi sintetizează, individual, proteinele Act proprii, ar putea constitui grupe de gene autoreglate. Ele ar corespunde genelor „master" ale lui Britten şi Davidson [22] care, *via* proteinele Act codate, îşi controlează nu numai propria activitate ci şi cea a altor gene, care codifică alte proteine, dar conţin secvenţe ENH controlate de proteinele Act.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Referinţe generale: a) Lewin B. (1987) *Genes*, John Wiley, New York; b) Adams M. D. (1995). Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature*, **377** (6547 – Supplement), 3; Goffean A. (1995) Life with 482 genes. *Science*, ***270***: 445; Freifelder D. (1986) *Molecular Biology*, Jones & Bartlett Publ., Boston.

Scanned with OKEN Scanner

2. Igo-Kelemes T., Hörz W., Zacchau A. G. (1982) Chromatin structure in eukaryotes. *Annu Rev Biochem,* **51**:89.

3. Corces V. G. (1995) Chromatin insulators. Keeping enhancers under control. *Nature,* **376**:462.

4. Novack R. (1994) Mining treasures from „junk DNA". *Science,* **263**:608.

5. Bullough W. S. (1967) The Evolution of Differentiation, Academic Press, London.

6. Green J. E., Goldberg B., Todaro J. G. (1966) Types of differentiated cells and regulation of collagen synthesis. *Nature,* **212**:331.

7. Bishop J. O. et al (1974) Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA, *Nature,* **250**:149.

8. Sarkar C., Sommer S. S. (1989) Access to a messenger RNA sequence or its protein is not limited by cell or tissue specificity. *Science,* **244**:331.

9. Holzer H., Rubinstein D. (1977) Quantal mitosis. In Nover L, Mothes K eds. *Cell Differentiation in Microorganisms, Plants and Animals,* Gustav Fischer, Berlin, p. 450.

10. a) Velculescu V. E. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science,* **270**:484; b) Kahn P. (1995) From genom to proteom. Looking at a cell's protein, *ibid.,* 369.

11. a) Wolffe A. P. (1994) Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription. *Trends Biochem Sci,* **19**:240; b) Workman J. L., Buchman A. R. (1993) Multiple functions of nucleosome and regulatory factors in transcription, *Trends Biochem Sci,* **18**:90.

12. Lucchini R., Sogo J. M. (1995) Replication of transcriptionally active chromatin. *Nature,* **374**:276.

13. Lovell-Badge R. (1995) Developmental genetics – Living with bad architecture. *Nature,* **376**:725.

14. a) Nordheim Am. (1994) Transcription factors. CREB takes CBP to tango. *Nature,* **370**:170; b) Maniatis T., Goodburn S., Fisher J. A. (1987) Regulation of inducible and tissue specific gene activation. *Science,* **236**:4837; c) Wingender E., Seifahrt K. H. (1987) Transkription in Eukaryoten. Die Role von Transkriptionscomplexen und ihre Komponenten. *Angew Chem,* **99**:206.

15. Cowell J. G. (1994) Repression versus activation in the control of gene transcription. *TiBS,* **19**:38.

16. Lehning N. (1994) An HMG-like protein can swich a transcriptional activator to a repressor, *Nature,* **371**:195.

17. Vogelstein B., Kinsler K. W. (1994) Tumour suppressor. X rays strike p. 53 again. *Nature,* **370**:174.

18. Ghosh G. (1995) Structure of a NF-KBxp50 homodimer bound to a kB-site. *Nature,* **373**:303.

Scanned with OKEN Scanner

CREŞTERE ŞI DIVIZIUNE CELULARĂ

Z. SIMON

Introducere

Creşterea ţesuturilor se realizează prin creşterea în volum şi greutate a celulelor şi prin diviziunea acestora. Celulele care se divid, fie ele independente, fie în ţesuturi, parcurg aşa-numitul *ciclu celular.* Acesta se împarte în următoarele faze: G_1 – sinteza de proteine (şi RNA), S – în care are loc replicarea DNA (în alte faze acest proces nu are loc), G_2 – sinteza de proteine şi M – mitoza, când are loc deplasarea spre cei doi poli ai celulei a materialului genetic şi diviziunea celulară propriu-zisă.

La ***bacterii (celulele procariote),*** ciclul celular este relativ simplu. Trebuie să se asigure prevenirea începerii paralele şi dezordonate a replicării cromozomului bacterian şi repartizarea exactă jumătate-jumătate, cel puţin pentru materialul genetic, de la celula părinte la cele două celule progenitor.

Există anumite relaţii volum celular $\overline{V}$ (mediu-creşte de la V_0 la $2V_0$ în cursul ciclului) – viteză de diviziune μ – mediu nutritiv – temperatură T [2]. Cel mai mult studiată este *Escherichia coli,* pentru care se dau date cantitative dar, calitativ, regularităţile descrise mai jos sunt valabile pentru toate bacteriile studiate. Astfel, cantitatea de proteină (şi $\overline{V}$) per echivalent haploid DNA sunt constante. La viteze de proliferare mici volumul mediu este constant; pentru $\mu \lesssim 1$ diviziune/oră, $V_0 \cong 0{,}3 \div 0{,}5 \times 10^{-12}$ cm^3. La viteze de proliferare mari, $\overline{V}$ creşte proporţional cu μ; maximal $\mu = 2{,}8$ diviziuni/oră, $\overline{V} = 2{,}0 \times 10^{-12}$ cm^3.

Cromozomul bacterian este circular şi are un singur *replicator* (situs de iniţiere al replicării). Pentru viteze de diviziune mari, $\mu > 1$ diviziune/oră, dispare faza G_1, au loc mai multe iniţieri de replicare DNA per ciclu, durata τ a ciclului ajungând mai scurtă decât durata minimă pentru faza S (40 minute) şi G_2 + M (20 minute). Celulele progenitor rezultate au până la doi cromozomi cu furci de replicare, pentru μ maxim. Mărimea ($\overline{V}$) şi compoziţia chimică depind puternic de compoziţia mediului nutritiv – sărac (de exemplu acetat, NH_4^+, săruri minerale), când μ este mic, sau bogat (glucoză + aminoacizi); ele nu depind de T dar μ depinde puternic de T.

Scanned with OKEN Scanner

Celulele eucariote. Au ciclul format din aceleaşi faze, cu o serie de regularităţi păstrate de la levuri *(Saccharomyces cerevisiae)* şi până la celulele de mamifer.

Lucrurile sunt mai complexe decât la procariote. Există mai mulţi cromozomi – 46 în celulele umane –, un număr mare de situsuri de iniţiere a replicării DNA – sute şi mii de replicatori în celulele umane. Sinteza DNA are loc în S, dar iniţierea replicării la diferite situsuri nu se face simultan. Există şi *plasmide,* organite celulare cu DNA (mitocondrii, cloroplaste) care se divid şi ele în cursul ciclului celular. Este astfel necesar un grad mai mare de coordonare decât la procariote – fiecare cromozom fiind replicat numai o dată în cursul ciclului celular. De asemenea, în faza M are loc condensarea cromozomilor, formarea fusului de diviziune, dezasamblarea membranei nucleare, tracţionarea cromozomilor spre cei doi poli şi, în sfârşit – diviziunea celulară.

Cu excepţia materialului genetic, repartizarea egală a celorlalte componente la celulele progenitură este destul de aproximativă. Şi durata ciclului, $\tau = \tau + \tau_1 + \tau_2$ pentru diferitele celule „identice" dintr-o cultură variază destul de mult în jurul unei valori medii [3].

Ciclul celular este dirijat de diferite „puncte de control" (check-points), celula trecând din starea de repaus, fără diviziune, denumită şi G_0, în ciclul activ (G_1), sau iniţierea fazelor S şi respectiv M. El depinde şi de anumiţi mesageri externi, ca prezenţa unor nutrienţi, sau, pentru celulele animalelor superioare, prezenţa anumitor hormoni şi factori de creştere. În special pentru celulele animalelor superioare, trecerea prin diferite „puncte de control" este legată de activarea transcripţiei unor gene şi inactivarea altora. Pentru aceste celule avem şi fenomenul *diviziunii diferenţiante* – celulele progenitură rezultate din ciclu cu seturi diferite de gene „aprinse" şi „stinse", comparativ cu celula părinte (vezi capitolul precedent, secţiunea „Reglajul activităţii genelor şi diferenţierea celulelor eucariote").

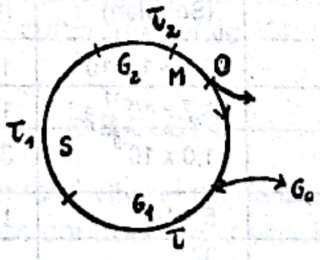


Figura 1

Celulele în ţesuturi

Prezintă o serie de caracteristici suplimentare comparativ cu cele corespunzătoare organismelor monocelulare, necesare reglării creşterii şi funcţionării ţesutului în întregime. Amintim în primul rând *inhibiţia de contact.* Dacă se cresc, în

Scanned with OKEN Scanner

cultură, celule prelevate din ţesuturi, acestea, în majoritatea cazurilor, se dezvoltă pe fundul vasului de cultură în strat monocelular; dacă fundul vasului este acoperit, creşterea se opreşte – nu mai creşte un al doilea, al treilea strat de celule.

Toate celulele unui organism conţin, cel puţin în linii mari, acelaşi genom, aceiaşi cromozomi, aceleaşi gene – aproximativ $3x10^{9}$ perechi de baze per complement haploid, sub $1x10^{-11}$ grame DNA per celulă diploidă. În diferite ţesuturi avem diferite seturi de gene aprinse şi stinse. Chiar în interiorul unui ţesut avem mai multe tipuri celulare, acestea, în cursul evoluţiei lor parcurgând mai multe stadii care, după o clasificare generală, mai mult sau mai puţin aproximativă, sunt [4]:

$$S \rightarrow P \leftrightarrow P_d \rightarrow Z$$

S – sunt celulele susă (stem cells) care, sub influenţa unor mesageri chimici, în urma unei diviziuni diferenţiante, trec într-o celulă S şi o celulă P. Numărul de celule S nu este astfel modificat de asemenea diviziuni. Celulele P se divid continuu, cu o viteză modulată de anumiţi mesageri (hormoni, de exemplu). După un număr mediu de k diviziuni, celulele P trec în celule P_d care efectuează funcţii histospecifice şi nu se divid decât în urma unor solicitări speciale, mediate hormonal (se află în faza G_0). Celulele P_d pot trece, în final, în celule mature Z care pierd în mod ireversibil capacitatea de a se divide. De exemplu, în sistemul hematopoietic, celulele susă S, în funcţie de mesagerul chimic pot trece în mai multe stadii P. Eritrocitele umane reprezintă un caz tipic de celule Z, cu funcţii histospecifice şi care au pierdut capacitatea de a se divide.

După cum se vede din tabelul 1, celulele de mamifer pot avea, în funcţie de stadiul de dezvoltare şi tip, mărimi şi compoziţii (per complement haploid DNA) mult diferite [3].

Tabelul 1. Parametri caracteristici pentru câteva celule de mamifer.

		Hepatocit (Şobolan)	Limfocit mic (şoarece)	Celule HeLa (umane)
Volum (cm^3)		$0,5 \div 1 \times 10^{-8}$	$1,5 \times 10^{-10}$	4×10^{-9}
DNA (gr/celulă)		$1,7 \times 10^{-11}$	1×10^{-11}	$1,6 \times 10^{-11}$
Proteină (gr/celulă)		$1,0 \times 10^{-9}$	3×10^{-11}	7×10^{-10}
RNA (gr/celulă)		5×10^{-11}	$1,3 \times 10^{-12}$	6×10^{-11}
	ribozomal(%)	33		80
	mesager (%)	33		5
	transport (%)	33		15
Ribozomi	(per celulă)	1×10^{7}	$2,5 \times 10^{5}$	1×10^{7}
Mitocondrii	(per celulă)	1×10^{4}	15	1×10^{4}
Viteze de sinteză				
	Proteine (aa/cel. h)	$2,5 \times 10^{10}$	4×10^{7}	$1,5 \times 10^{11}$
	RNA (nucl./cel. h)	$1,2 \times 10^{9}$	3×10^{4}	5×10^{9}
	ATP (molec./cel. h)	5×10^{12}	3×10^{10}	$2,5 \times 10^{12}$

Scanned with OKEN Scanner

După cum se vede, cantitatea de DNA per celulă variază puţin. Hepatocitele şi limfocitele sunt celule P_d – hepatocitele cu metabolism activ, limfocitele „în aşteptare" de agenţi activanţi (de procese imunitare). Celulele HeLa sunt celule dediferenţiate care se divid rapid (ciclu $\tau_0 = 18 \div 24$ h) în cultură.

Reglarea mărimii unui ţesut se face prin mai multe procese: frecvenţa diviziunilor S → P şi numărul de diviziuni k în timpul maturării care, la rândul lui, este micşorat de viteza tranziţiilor la tipurile mature (P_d, Z) şi, în sfârşit, de viteza de degradare a celulelor ajunse în stadiul final, Z (viteza de descuamare la ţesuturile epiteliale).

Celulele crescute în cultură degenerează şi mor după aproximativ 50 cicluri de diviziune. Este vorba, evident, de celule ce se reînsămânţează după un număr de diviziuni (după ce se realizează stratul monomolecular compact). O mică parte din celulele astfel reînsămânţate suferă un proces de *dediferenţiere,* adică tind, indiferent de ţesutul de origine, spre caracteristici comune, cu pierderea funcţiilor histospecifice iniţiale şi lipsa de răspuns la semnalele limitative ale creşterii. Asemenea celule dediferenţiate pierd inhibiţia de contact şi pot creşte, în culturi, în straturi multiple pe fundul vaselor de cultură.

Este evident că celulele ţesuturilor normale trebuie să răspundă la multiple mecanisme de reglaj ale vitezei de creştere. Factori precum mutaţiile vor avea o oarecare probabilitate de a micşora sensibilitatea la mecanismele de inhibiţie a creşterii. Aceste celule, cu viteza de diviziune mărită, vor tinde să crească procentual în raport cu cele normale. Alte mutaţii – cu ocazia ciclurilor de diviziune mai frecvente – vor defecta alte mecanisme de reglaj, ducând la o creştere suplimentară a vitezei de proliferare. De altfel, toate substanţele mutagene sau care dau metaboliţi mutageni, au efecte cancerigene. Celulele tumorale, pe măsura avansării bolii, devin tot mai rapid crescătoare şi tot mai similare cu celulele dediferenţiate obţinute prin pasaje multiple pe culturi de celule [5].

Bacterii

Un model vechi pentru controlul vitezei de diviziune se bazează pe ipoteza că iniţierea sintezei DNA (punctul de control G_1/S) necesită prezenţa unei cantităţi prag a unei anumite proteine. Proteina s-ar lega la cromozom pornind de la replicator în sensul în care decurge sinteza DNA (furca de replicare). Iniţierea are loc în momentul când acoperirea cu proteină reajunge la replicator. Catenele DNA din cei doi „dinţi" ai furcii sunt numai pe jumătate acoperite cu această proteină, sau proteina este distrusă în locul în care ajunge bifurcaţia.

La începutul ciclului nu există cantitatea prag de proteină. Cu cât mediul de cultură este mai bogat, sintezele mai rapide, cu atât mai repede se sintetizează cantitatea prag de proteină. În medii foarte bogate, când sinteza DNA a atins limita

Scanned with OKEN Scanner

superioară, cantitatea prag se sintetizează înainte de terminarea replicării cromozomului și apar două furci noi la capetele vechii furci. În aceste condiții, celulele progenitură moștenesc mai mult decât un cromozom – un cromozom cu o furcă pe el sau chiar doi cromozomi. În acest model se presupune că durata fazelor G_2 + M este constantă.

Mecanismele moleculare ale ciclului celular

Diferitele puncte de control (G_0/G_1, G_1/S, G_2/M) au diferite mecanisme de control. Fiecare mecanism implică interacția mai multor tipuri de proteine, unele cu caracter de enzimă – în special protein-kinaze care fosforilează specific anumite proteine substrat la anumite poziții. Aceste fosforilări activează sau deactivează, în funcție de poziția fosforilată, aceste proteine. O serie de membri ai acestor clase de proteine sunt comuni între procariote și eucariote și, în special, între eucariote, de la levuri *(Saccharomyces cerevisiae)* la batracieni *(Xenopus)* și, atât cât s-au efectuat studii, celula de mamifer. Domeniul este în plină dezvoltare și utilizarea, de către diferite grupe de cercetători, de notații diferite pentru una și aceeași proteină, face dificilă înțelegerea acestor fenomene.

Dintre principalii actori amintim [7]:

– *secvențe replicante autonome,* ARS, secvențe DNA scurte care, incluse în DNA-ul plasmidelor, permit replicarea sincronă cu cromozomii celulei (în levuri). ARS de la levuri sunt similare cu cele de la virusuri și bacterii. ARS constă dintr-o secvență de 11 bp conservată pe scara filogenetică, plus 2–3 secvențe scurte adiționale, toate grupate în cadrul unei secvențe DNA de 100 ÷ 200 bp.

– *ciclinele,* cycl – sunt proteine asociate cu diferite puncte de control; cyclD pare asociată cu toate punctele, cyclE cu G_1/S, cyclA cu S/G_2, cyclB cu G_2/M.

– *ciclin kinaze,* cdc (sau CDK) sau kinaze cyclin-dependente, catalizează fosforilarea ciclinelor.

– *factori de „licență",* din clasa proteinelor MCM, existente în toate celulele eucariote cercetate, sunt necesare pentru inițierea replicării DNA, sunt stocate în citoplasma cu acces la gene numai în faza M (când dispare membrana nucleară) și se distrug în cursul replicării.

– *origin recognition complex,* ORC, reprezintă un complex de șase proteine care leagă ARS, rămân legate de-a lungul întregului ciclu celular și reprezintă o condiție necesară dar nu suficientă pentru pornirea replicării DNA.

Mecanismul prin care se asigură replicarea numai o singură dată per ciclu celular a tuturor cromozomilor (46 la om) s-ar baza pe factorul de „licență" MCM care, sintetizat în citoplasmă, ajunge la cromozomi numai în faza M, când se desface membrana nucleară. În M, MCM se leagă de ORC și formează un *complex* (sau complecși, la multiplele ARS) *de prereplicare.* Acest complex de prereplicare

Scanned with OKEN Scanner

se transformă în *complex de replicare* (cu inițiere de sinteza DNA la unul sau mai mulți ARS) prin adiția unei (unor) proteine „P_A" ce se sintetizează (sau pătrunde) în nucleu. Cu inițierea sintezei DNA la ARS, proteina MCM din complexul de replicare este distrusă. Deși ORC rămâne la ARS-ul respectiv, lipsind MCM (care nu există liber în nucleu), chiar în prezența de P_A nu poate fi inițiată o nouă sinteză de DNA. Numai după mitoză, când MCM din citoplasmă se leagă la acest ORC, în următorul ciclu, în prezența P_A, poate avea loc o nouă inițiere de sinteză DNA (vezi schema de reglare a sintezei ordonate a DNA din figura 2).

Această proteină „P_A" ar putea fi un complex de tip cdc 2 x cyclE. Check-pointul G_1/S pare să se deruleze după următorul mecanism. Prin combinare cu proteina p27, rezultă complexul cdc2 x cyclE x p27 inactiv. În celulă ar exista un nivel constant de p27 care ar trebui depășit prin sinteza unei cantități prag de ciclină E. Este posibil să intervină și unele procese de fosforilare (catalizate prin cdc2) în acest proces de activare a complexului, notat de noi „P_A".

M: MCM (citoplasmă) ⟶ MCM (nucleu)
MCM + ORC ⟶ ORC* (nucleu)
G_1: sinteza MCM (citoplasmă, NU trece în nucleu)
sinteza P_A; P_A + p27 → inactiv (citoplasmă ⇔ nucleu)
check-point G_1 → S: P_A>prag, rămâne P_A activ (necombinat cu p27)
S: ORC* + P_A →ORC# (activ) →inițierea sintezei DNA + ORC + MCM inactiv (nucleu)

Figura 2

Este interesant cum acționează factorul inhibitor al creșterii, TGF-β. Acesta activează gena care codifică proteina p15. La rândul ei, p15 scoate p27 din complexul cdc4 x cyclD x p27, complex inactiv din punct de vedere al check-pointului G_1/S. Proteina p27 astfel eliberată se poate combina cu complexul activ cdc2 x cyclE, inactivându-l. Din cdc4 x cyclD x p27 + p15 rezultă astfel p27 + cdc4 x p15 + cyclD. Ultima proteină, cyclD, suferă o degradare enzimatică, fiind împiedicată blocarea p27 prin reformarea complexului cdc4 x cyclD x p27 (vezi schema de reglaj check-point a tranziției G_1/S prin inhibitorul de creștere TGF-β din figura 3).

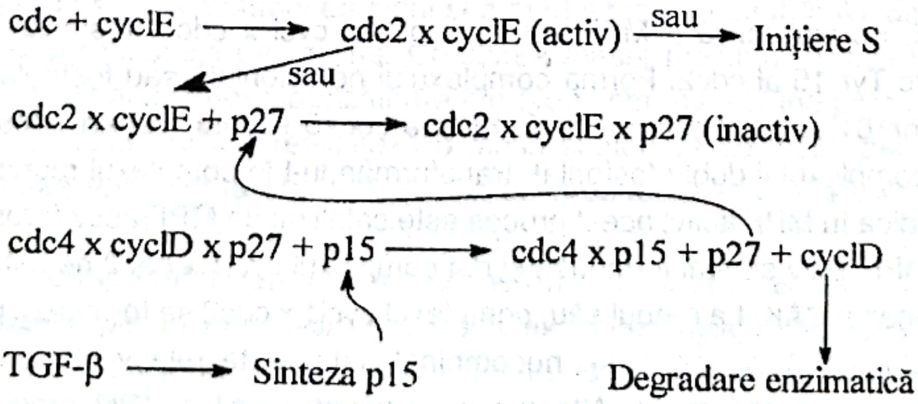


Figura 3

Scanned with OKEN Scanner

se transformă în *complex de replicare* (cu inițiere de sinteza DNA la unul sau mai mulți ARS) prin adiția unei (unor) proteine „P_A" ce se sintetizează (sau pătrunde) în nucleu. Cu inițierea sintezei DNA la ARS, proteina MCM din complexul de replicare este distrusă. Deși ORC rămâne la ARS-ul respectiv, lipsind MCM (care nu există liber în nucleu), chiar în prezența de P_A nu poate fi inițiată o nouă sinteză de DNA. Numai după mitoză, când MCM din citoplasmă se leagă la acest ORC, în următorul ciclu, în prezența P_A, poate avea loc o nouă inițiere de sinteză DNA (vezi schema de reglare a sintezei ordonate a DNA din figura 2).

Această proteină „P_A" ar putea fi un complex de tip cdc 2 x cyclE. Check-pointul G_1/S pare să se deruleze după următorul mecanism. Prin combinare cu proteina p27, rezultă complexul cdc2 x cyclE x p27 inactiv. În celulă ar exista un nivel constant de p27 care ar trebui depășit prin sinteza unei cantități prag de ciclină E. Este posibil să intervină și unele procese de fosforilare (catalizate prin cdc2) în acest proces de activare a complexului, notat de noi „P_A".

M: MCM (citoplasmă) ⟶ MCM (nucleu)
MCM + ORC ⟶ ORC* (nucleu)
G_1: sinteza MCM (citoplasmă, NU trece în nucleu)
sinteza P_A; P_A + p27 → inactiv (citoplasmă ⇔ nucleu)
check-point G_1 → S: P_A>prag, rămâne P_A activ (necombinat cu p27)
S: ORC* + P_A →ORC# (activ) →inițierea sintezei DNA + ORC + MCM inactiv (nucleu)

Figura 2

Este interesant cum acționează factorul inhibitor al creșterii, TGF-β. Acesta activează gena care codifică proteina p15. La rândul ei, p15 scoate p27 din complexul cdc4 x cyclD x p27, complex inactiv din punct de vedere al check-pointului G_1/S. Proteina p27 astfel eliberată se poate combina cu complexul activ cdc2 x cyclE, inactivându-l. Din cdc4 x cyclD x p27 + p15 rezultă astfel p27 + cdc4 x p15 + cyclD. Ultima proteină, cyclD, suferă o degradare enzimatică, fiind împiedicată blocarea p27 prin reformarea complexului cdc4 x cyclD x p27 (vezi schema de reglaj check-point a tranziției G_1/S prin inhibitorul de creștere TGF-β din figura 3).

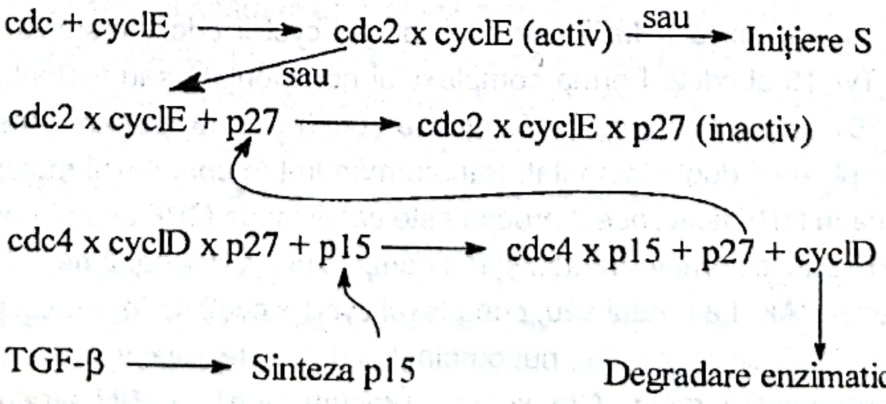


Figura 3

Scanned with OKEN Scanner

Punctele de control (check-point) pentru tranzițiile G_1/S, S/G_2, G_2/M par să implice depășirea unui prag de către ciclinele E, A și respectiv B, prag necesar pentru neutralizarea unor inhibitori gen p27. După depășirea check-pointului, concentrația sau activitatea ciclinei respective scade din nou și nu mai crește în cursul ciclului respectiv. Această variație de activitate sugerează aprinderea și stingerea succesivă a genelor ce codifică ciclinele respective, eventual și alte proteine implicate în punctele de control și în procesele ce au loc în diferite faze (vezi figura 4).

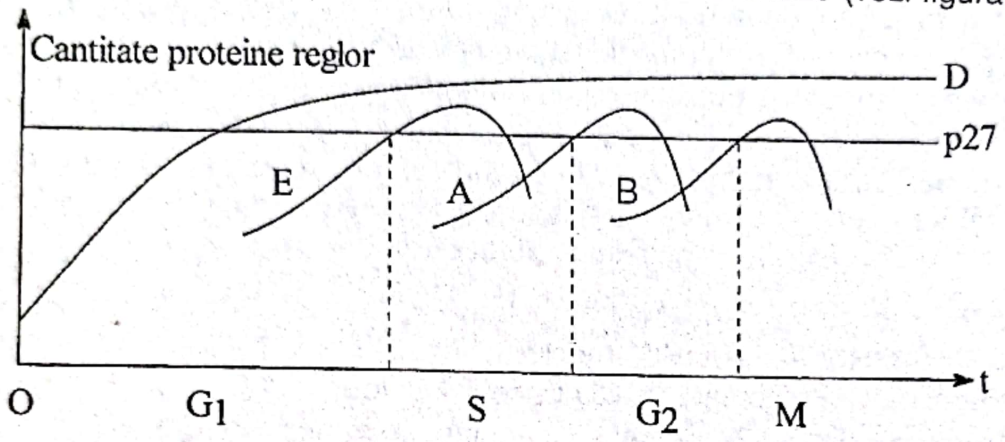


Figura 4

Alte explicații pentru aceste variații ale activității ciclinelor în cursul ciclului se bazează pe procese de fosforilări activante și dezactivante catalizate de kinaze cdc, pe procese de degradare catalizate de diferiți componenți ai sistemului.

Pentru check-pointul G_2/M sistemul pare să se bazeze pe interacția dintre ciclina B (cyclB) și proteina MPF (Maturation Promoting Factor), nu neapărat pe schimbarea gradului de activare a unor gene. Un model matematic relativ simplu din 1991, bazat pe analiza datelor experimentale presupune sinteza MPF proporțională cu concentrația (activitatea) cycl și parțial autocatalitică [8].

Un model mai complex din 1993, bazat tot pe analiza datelor experimentale privind sistemele implicate în ciclul celular al levurilor și amfibienilor, implică vreo 18 participanți. Forma activă a MPF este complexul cycl x cdc2, fosforilat la restul aminoacidic Tyr 15 al cdc2. Forma complexului nefosforilată sau fosforilată și/sau la restul Thr161 al cdc2 este inactivă. Kinaza cdc25 scoate gruparea fosfat de la Thr161 a complexului dublu fosforilat, transformându-l în complexul monofosforilat la Tyr15, adică în MPF activ; acest proces este catalizat de MPF activ (proces autocatalitic). MPF activ se mai formează și din complexul cycl1 x cdc2 nefosforilat sub acțiunea kinazei CAK. La rândul său, complexul cycl1 x cdc2 se formează prin combinarea celor două componente: necombinat, cdc2 este relativ stabil dar cycl1 (liberă) se degradează rapid. Alte kinaze, precum wee1 și INH produc supra-

Scanned with OKEN Scanner

fosforilări sau defosforilări ce inactivează MPF activ; DNA nereplicat catalizează şi el procese ce duc la inactivarea MPF (vezi figura 5).

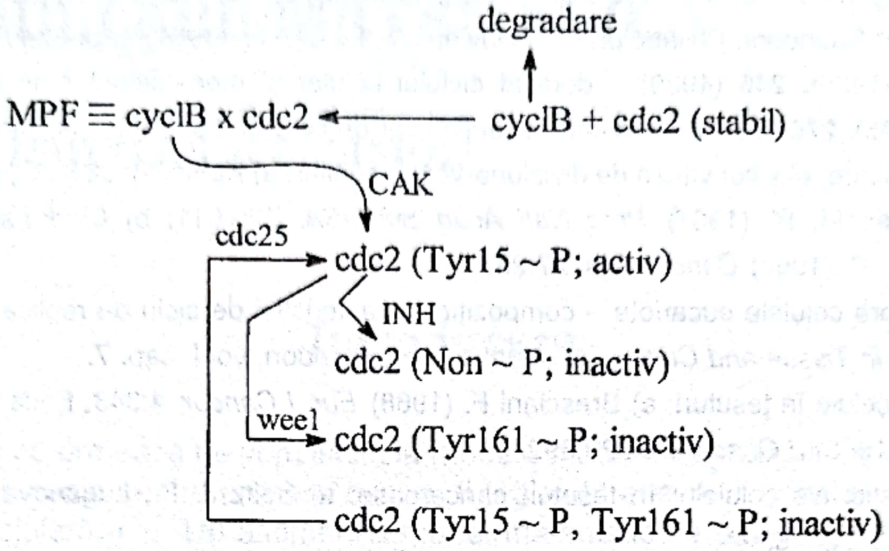


Figura 5

Homeostazia tisulară

Reglarea creşterii şi a volumului ţesuturilor – se poate înţelege, calitativ, în baza schemei Bresciani (S → P → Pd → Z). Este influenţată şi de viteza diviziunilor S → S + P şi de viteza de tranziţie de la formele proliferative la cele neproliferative şi de numărul K de cicluri realizate de P până la transformarea în formele Pd şi Z ce nu se divid. Este reglată şi pierderea (moartea) celulelor mature Z.

O teorie simplă şi elegantă pentru homeostazia tisulară este cea a chalonelor lui Bullough [9]. Fiecare ţesut ar produce un factor histospecific, chalona, care acţionează în sensul scăderii creşterii şi a măririi pierderii numărului de celule, dar numai asupra ţesutului de origine. Creşterea masei (volumului) unui ţesut creşte concentraţia chalonei corespunzătoare din organism, micşorând procesele ce duc la creşterea ţesutului. Se realizează o masă staţionară de ţesut, dependentă de sensibilitatea ţesutului la chalonă, viteza de producere şi viteza de degradare a chalonei. Procesul este influenţat de diferiţi hormoni.

Deşi s-a raportat izolarea unor chalone (în anii '70), homeostazia tisulară pare să se bazeze pe un mecanism mai complex, care implică interacţia mai multor factori promotori şi inhibitori ai creşterii, fiecare factor acţionând asupra mai multor (dar nu a tuturor) ţesuturi.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Referinţe generale: a) de Robertis E. D. P., Novinski W. W., Saez P. A. (1960) General Cytology. WB Saunders, Philadelphia; b) Howard A., Pelc S. R. (1951) *Expl Cell Res,* **2**:178; c) *Science* (1989), **246** (4930) – dedicat ciclului celular şi mecanismelor de control; d) *Science* (1995), **270** (5242) – dedicat mecanismelor de control ale ciclului celular.

2. Studii dedicate relaţiilor viteza de diviziune-volum celular: a) Kubitscheck H. F., Bendigkeit H. E., Locken M. R. (1967) *Proc Natl Acad Sci USA,* **57**:1611; b) Clark-Lambert W., Studzinski G. P. (1967) *Cancer Res,* **27**:236.

3. Date despre celulele eucariote – compoziţie, caracteristici de ciclu de replicare: Paul J. (1965) *Cells in Tissue and Culture,* Academic Press, London, vol I, cap. 7.

4. Tipuri de celule în ţesuturi: a) Bresciani F. (1968) *Eur J Cancer,* **4**:343; Epifanova O. J., Terskih VV (1968) *J Obscei Biol,* 29:392.

5. Caracteristici ale celulelor în ţesuturi canceroase: a) Seitz J. F., Luganova S. (1968) *Cancer Res,* **28**:2548.

6. Model de ciclu celular la bacterii: a) Cooper S., Helmstetter C. E. (1968) *J Mol Biol,* **31** (507): 509; Helmstetter C. E., Pierucci O. (1968) *J Bacteriol,* **95**:1627.

7. Macromolecule implicate în reglarea ciclului celular: a) Pines J (1993) *TiBS,* **18**:195; b) Dasso M (1993) *TiBS,* **18**:96; c) La Thangue N. B. (1994) *TiBS,* **19**:108; d) Peters G. (1994) *Nature,* **371**:204.

8. Modele matematice pentru ciclul celular: a) Norel R., Agur Z. (1991) *Science,* **251**:1076; b) Novack B., Tyson J. J. (1993) *J Theor Biol,* **165**:101.

9. Chalone: Bullough W. S. et al. (1968) *Eur J Cancer,* **4**:587, 595, 607.

MODELARE MATEMATICĂ

G. I. MIHALAŞ şi Z. SIMON

Introducere

În cele ce urmează ne vom limita la modele matematice bazate pe sisteme de ecuaţii diferenţiale pentru procese cum ar fi reglajul transcrierii genelor, creştere şi diviziune celulară, etc. Un asemenea model matematic se bazează pe un set de procese, la nivel subcelular, reale sau ipotetice – modelul biologic sau citologic al procesului de reglaj celular. Aceste procese sunt tratate ca procese cinetice în care se produc şi se consumă anumite substanţe. Cantităţile per celulă, sau concentraţiile acestor substanţe, eventual în compartimente diferite, sunt variabilele modelului matematic, dependente de timp. Procesele cinetice sunt transcrise, fiecare, sub forma unei ecuaţii diferenţiale, modelul matematic constând din sistemul acestor ecuaţii diferenţiale. Dacă nu se consideră explicit gradienţii de concentraţie, un asemenea sistem are forma generală:

$$\frac{dx_i}{dt} = f_i\,(\ldots, x_j, x_j, \ldots; \lambda_\alpha, \lambda_\beta, \ldots);\ i, j = 1, 2, \ldots \qquad (1)$$

Aici x_i reprezintă concentraţii (cantităţi per celulă) iar λ_α, λ_β, ... diferiţi parametri (constante de viteză, de echilibru etc.). De regulă nu se cunosc toţi parametrii λ_α, λ_β ... Se urmăreşte, pentru valori rezonabile ale acestor parametri, dacă modelul matematic prezintă stări staţionare sau stări oscilatorii, care pot să reflecte – uneori chiar şi semicantitativ, caracteristicile principale ale procesului de reglaj studiat. Limitele de stabilitate ale acestor stări pot da indicaţii asupra stabilităţii funcţionale a procesului biologic şi asupra condiţiilor de trecere de la un tip de funcţionare la altul.

Exemplu – Model matematic pentru gena autoreglată

În celulele eucariote reglajul transcrierii genelor este un proces preponderent pozitiv. Starea „de bază" este gena „stinsă". Transcrierea genei este „pornită" atunci când o proteină nucleară nonhistonică activatoare, o notăm aici P_i, se prinde de un

Scanned with OKEN Scanner

situs activator, E_i (enhancer, promotor), al genei – o secvenţă de perechi de nucleotide ale elicei duble DNA corespunzătoare. Acest situs activator este situat în „amonte", faţă de punctul de pornire al transcrierii genei. O descriere a secvenţelor de control pentru reglajul expresiei histospecifice a genelor este dată în review-ul lui Maniatis, Goodburn şi Fischer [1].

O problemă a reglajului transcrierii genelor este explicarea funcţionării histospecifice a genelor: într-un tip celular, anumite gene sunt „aprinse", celelalte – marea majoritate – sunt „stinse". O explicaţie calitativă a acestei funcţionări este dată de modelul genei autoreglate a lui Ptashne [2]. Gena GS_i ce codează proteina activatoare P_i are un situs activator E_i, capabil să „prindă", să răspundă la P_i (vezi figura 1). Sistemul $GS_i - P_i - E_i$ funcţionează ca un bistabil. Dacă un activator exterior activează gena şi se realizează o concentraţie suficientă de P_i, aceasta activează, via elementul activator E_i, gena GS_i şi gena prin retroacţiune pozitivă rămâne activată. Dacă un inhibitor exterior scade concentraţia lui P_i sub o limită, acesta disociază de pe E_i, sinteza sa se opreşte, gena este stinsă şi rămâne stinsă.

Modelul matematic ce-l vom descrie succint, a fost descris pe larg într-un capitol dintr-un tratat [3].

Pentru ilustrare redăm aici o variantă puţin simplificată, descrisă prin sistemul de ecuaţii:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\varphi}{V} \cdot A - \lambda_N x \qquad (2.a)$$

$$\frac{dy}{dt} = \psi x - \lambda_P y \qquad (2.b)$$

$$A = \frac{y^n}{K + y^n} \qquad (2.c)$$

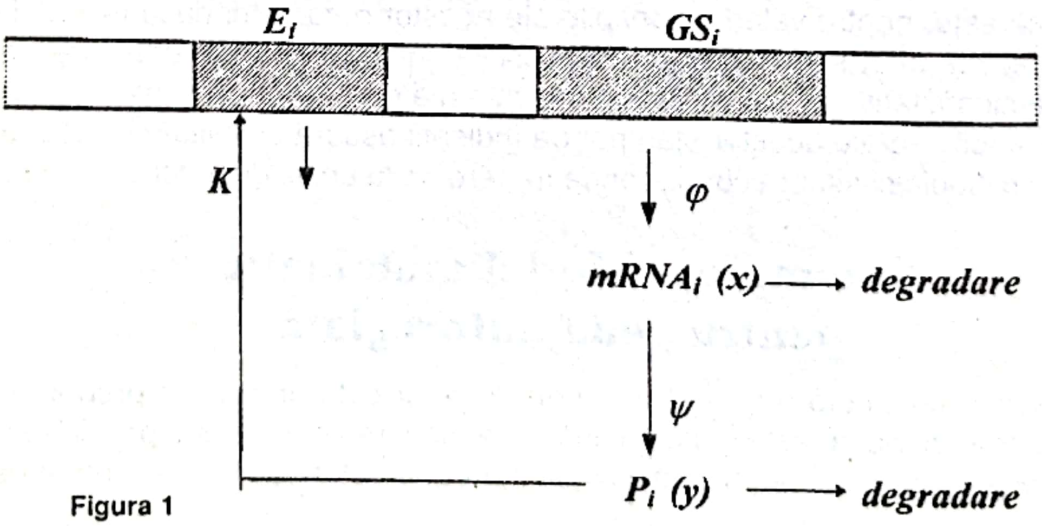


Figura 1

Scanned with OKEN Scanner

Aici x este concentraţia *mRNA*, y – cea a proteinei activitoare, φ – viteza de transcripţie a genei iar ψ, viteza de translaţie a *mRNA*, λ_N şi λ_P – vitezele de degradare a *mRNA* respectiv P, A – gradul de activare al genei. Aici $n \geq 1$ reflectă observaţia experimentală (vezi de exemplu [1]) că pe situsul activator E_i se prind, de regulă, două sau mai multe molecule de proteină activator.

S-a făcut un studiu calitativ al sistemului de ecuaţii (2 . a, b, c) cât şi o simulare pe calculator, pentru diferite valori ale vitezelor de sinteză, degradare (φ, ψ, λ_N şi λ_P), volum celular (V) şi ale constantei de disociere (K) a lui P_i de pe E_i. Ce aduce acest studiu matematic în plus faţă de deducţiile calitative pe baza modelului biologic?

În primul rând, studiul calitativ al sistemului (2) demonstrează că se pot obţine două stări staţionare stabile:

$$x_0 = 0,\ y_0 = 0;\quad x_1 \cong \frac{\varphi}{V\lambda_N},\quad y_1 \cong \frac{\varphi\,\psi}{V\lambda_N\lambda_p} \qquad (3)$$

numai dacă are loc prinderea a cel puţin $n = 2$ molecule P_i de situsul activator E_i. Se explică astfel de ce „Natura" n-a mers pe varianta cea mai simplă – o moleculă P_i suficientă pentru activare.

În al doilea rând, pornind de la valori de ordinul celor experimentale pentru parametrii modelului (luate, în special, din studii asupra activării specifice ale unor gene prin hormoni steroizi) se obţin, de asemenea, valori de ordinul celor determinate experimental pentru concentraţia y_1 a proteinei activator şi pentru duratele de timp necesare acţionării unui factor extern (hormonul steroid) pentru „aprinderea" specifică a unor gene. De asemenea, se obţin domenii de stabilitate rezonabilă (în ceea ce priveşte concentraţia x, y) pentru cele două stări staţionare – „stinsă" (0) şi „aprinsă" (1) a funcţionării genei autoreglate şi implicit şi a altor gene activate de aceeaşi proteină activator, P_i, care însă codează alte proteine.

Simularea pe calculator, chiar şi a acestui model simplu, a fost necesară pentru că nu se pot obţine soluţii analitice pentru variabilele implicate (aici x şi y). Un studiu calitativ al sistemelor de ecuaţii diferenţiale de tip (1), cu deducerea unor expresii aproximative pentru variabilele x_i este cât se poate de rezonabil pentru alegerea unor seturi potrivite de parametri λ_α şi λ_β ..., ceea ce chiar şi pentru calculatoare extrem de puternice, ar implica durate de rulare foarte mari pentru studiul unui asemenea model matematic.

Modele pentru ciclul mitotic

Un domeniu în care s-au elaborat modele matematice bazate pe o analiză a sistemelor de reacţie care intervin în proces, este cel al ciclului mitotic (vezi capitolul respectiv). Vom descrie aici modele pentru punctul de control care determină trecerea de la faza G_2 la M.

Scanned with OKEN Scanner

După cum am arătat, tranziția $G_2 \rightarrow M$ pare să se bazeze în principal, pe interacția între cyclina B *(cycl)* și proteina *MPF* (maturation promotion factor). Un model matematic relativ simplu [4] se bazează pe interacția între acești doi factori. Se presupune că sinteza *cycl* are loc cu viteză constantă dar degradarea sa este proporțională cu concentrația *MPF*, iar sinteza *MPF* este atât autocatalitică, cât și proporțională cu concentrația *cycl*. Două ecuații sunt suficiente pentru descrierea modelului:

$$\frac{d[MPF]}{dt} = (e + f[MPF]^2)\,[cycl] - \frac{g[MPF]}{[MPF] + h} \qquad (4.a)$$

$$\frac{d[cycl]}{dt} = i - j[MPF]\,\frac{[cycl]}{[cycl] + k} \qquad (4.b)$$

Cantitățile în paranteze drepte, [ ] reprezintă concentrații, literele mici *e, f, i* – constante de viteză de sinteză, *g, j* – constante de degradare, *h, k* – constante tip Mihaelis (pentru degradări enzimatice).

Datorită caracterului autocatalitic, concentrația *MPF* crește rapid, viteza maximă de degradare enzimatică (de saturare cu *MPF*) fiind *g*. Creșterea concentrației *MPF* duce la creșterea vitezei de degradare a *cycl*, sintetizată cu o viteză constantă, *i*. Viteza de sinteză a *MPF* este însă proporțională cu [*cycl*], așa că după o perioadă de creștere rapidă a *[MPF]* și de scădere a [*cycl*], urmează o perioadă de scădere și a *[MPF]*. Scăderea *[MPF]* sub limita la care viteza de degradare a cycl devine mai mică decât viteza de sinteză, i, permite după o perioadă de timp, refacerea nivelului de cycl necesar creșterii vitezei de sinteză a *MPF* și a concentrației acestuia.

Un model mult mai complex a fost stabilit, tot pentru tranziția $G_2 \rightarrow M$, pentru *Saccharomices pombe*, pe baza marelui număr de date care s-au acumulat pentru fiziologia, genetica și biologia moleculară a ciclului celular pentru această levură [5]. Din aceste informații s-a construit un mecanism molecular detaliat al controlului fazei *M*, bazat pe modificarea *MPF* printr-o serie de protein kinase (de ex. Wee 1 și Mik 1 care inhibă *MPF*) și fosfataze (de ex. *Cdc25* care activează *MPF*). În particular s-a analizat check-pointul de interfază în S. pombe, unde celula nativă confirmă că faza S este completă și celula suficient de mare pentru a se termina ciclul de diviziune. În acest model, replicarea *DNA* incompletă restrânge pornirea fazei *M* prin inhibarea *Cdc25* și activarea *Mik1*, pe când creșterea mărimii celulei o împinge spre mitoză prin scăderea (diluarea) proteinei *Wee1*. Prin modele matematice standard ale cineticii chimice se arată că modelul dă seama cantitativ exact de efectele tratamentului cu hidroxiuree, schimbarea mediului nutritiv și alte perturbări ale ciclului celulelor native și mutante. Modelul conține în total 24 ecuații diferențiale și relații între concentrații și tot atâtea variabile (concentrații). Evident, intuitiv, este greu de explicat funcționarea unui asemenea model, care se studiază prin simulare pe calculator.

Scanned with OKEN Scanner

Realizări

După descifrarea de către Jacob şi Monod [6] a reglajului genelor la bacterii, reglaj în esenţă negativ, în anii '60 şi începutul anilor '70 modelarea matematică a reglajului celular a fost la mare modă. Pe lângă modelele bazate pe ecuaţii diferenţiale, s-au încercat şi modele bazate pe circuite logice, cu introducerea ideii de automaton molecular [7], utilizată în aşa-numitele reţele genetice – ca model pentru creştere şi diferenţiere în ţesuturi [8], iar o trecere în revistă amplă privind modelele matematice pentru reglaj celular a fost publicată în Internat. Review of Citology [9].

Aceste modele matematice au arătat că modele biologice rezonabile pot da explicaţii, cel puţin plauzibile, pentru caracteristici ale reglajului celular. Totuşi – chiar şi reproducerea semicantitativă a unor caracteristici, nu înseamnă că modelul biologic ce stă la baza celui matematic este şi real. Reproducerea calitativă sau chiar semicantitativă a unor caracteristici ale fenomenului biologic se poate datora şi unei potriveli întâmplătoare, unei alegeri fericite de combinaţii de valori pentru parametri de tip $\lambda_\alpha, \lambda_\beta$ ..., care sunt parametri ajustabili. Aceasta explică scăderea cel puţin ca pondere relativă, până relativ recent, a studiilor de modelare matematică a reglajului celular.

În momentul actual accentul se pune pe studii experimentale ale receptorilor biologici, ale interacţiei lor cu mesageri chimici, ale lanţului transmiterii semnalelor de la receptori de pe suprafaţa celulară la receptori intranucleari. Pare însă puţin probabil că înţelegerea, chiar şi calitativă, a funcţionării unei reţele complexe şi înalt interconectate de asemenea receptori şi mesageri chimici numai intracelulari să fie posibilă pe bază de considerente numai calitative. Modelarea matematică, foarte probabil, se va dovedi ca un instrument absolut necesar pentru înţelegerea reglajului celular, după ce – în linii mari, – principalii receptori şi mesageri chimici intracelulari vor fi cunoscuţi. Asemenea modele vor fi însă mult mai complexe decât cele ale anilor '60 şi '70, necesitând – pe lângă calculatoare mai puternice şi o teorie calitativă mai eficientă. Din acest punct de vedere aşa-numita „teorie a catastrofelor" ar putea fi extrem de utilă dacă este capabilă să facă unele predicţii asupra comportării sistemului de ecuaţii diferenţiale fără a rezolva sistemul de ecuaţii.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. T. Maniatis, S. Goodburn, J. A. Fischer: Regulation of inducible and tissue specific gene expression. *Science* **236,** 4837 (1987).

2. M. P. Ptashne, et al: Autoregulation and function of a repressor in the lambda bacteriophague. *Science* **194,** 156 (1976).

Scanned with OKEN Scanner

3. a) Z. Simon, N. Voiculetz: Trigger models for gene activity regulation, *in V. Voiculetz et al eds, Modeling of Cancer Genesis and Prevention,* CRCPress, Boca Raton, Fla, 1991, p. 13; b) G. I. Mihalas, I. Niculescu-Duvaz, Z. Simon: Trigger with positive control for gene activity regulation, Computer simulation, *Studia Biophys (Berlin)* **107,** 223 (1985).

4. R. Norel, Z. Agur: A model for the adjustment of the mitotic clock by cyclin and MPF levels. *Science* **251,** 1076 (1991).

5. B. Novack, J. J. Tyson: Quantitative analysis of a molecular model of mitotic control in fission yeast. *J. Theoret. Biol* **173,** 285 (1995).

6. J. Monod, F. Jacob: Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth and differentiation, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **26,** 389 (1961)

7. M. Sugita: Functional analysis of chemical in vivo sistems by use of logic circuit equivalent. The molecular automaton ideea. *J. Theoret. Biol.* **4,** 179 (1963).

8. a) R. Tsanev, B. Sendov: Model for a regulatory mechanism of cell multiplication. *J. Theoret. Biol.* **12,** 327 (1966); b) S.A. Kauffman: Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets, *J. Theoret. Biol.* **22,** 437 (1969).

9. R. Rosen: Review on mathematical modelling and general system theory in cell regulation processes, *Internat. Rev. Cytol.* **23,** 25 (1968)

Scanned with OKEN Scanner

APOPTOZA, O ABORDARE MOLECULARĂ

C. A. ŢAŢU

Introducere

În ciuda denumirii care are, mai degrabă, o rezonanţă negativă, moartea celulară programată (sau, într-un sens mai restrâns, apoptoza) este de cele mai multe ori un proces bine intenţionat. Controlată riguros printr-un program endogen practic existent în toate celulele, ea constă în autodistrugerea celulei în mai multe etape morfologic distincte. Aspectul morfologic, tipic, al unei celule apoptotice este prezentat în figura 1.

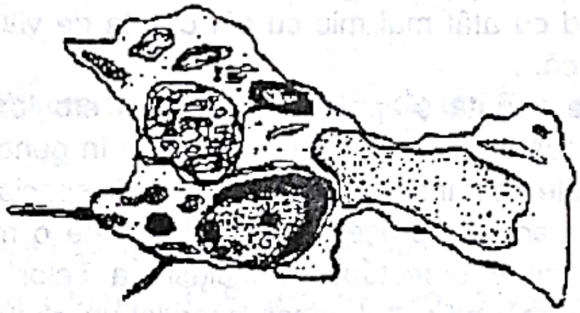


Figura 1

Apoptoza a fost descrisă atât la vertebrate cât şi la nevertebrate multicelulare (nematode şi insecte) [1] şi are rol principal în morfogeneză şi histogeneză. Astfel, la nematodul *Caenorhabditis elegans* s-au identificat trei gene *(ced)* cu rol în apoptoză, în timp ce la *Drosophila* şi la mamifere situaţia este mai complexă, cu implicarea a numeroase semnale extra- şi intracelulare [2,3].

Date mai recente pledează pentru existenţa unui proces apoptotic şi la eucariotele unicelulare şi chiar la eubacterii [4], încât originea morţii celulare programate coboară mult mai mult în timp decât se bănuia iniţial (vezi figura 2). De exemplu, la *Trypanosoma cruzi* [5] trecerea din stadiul de epimastigot în diviziune la cel de tripomastigot în faza G_0/G_1 este urmată de moartea programată care are trăsăturile apoptozei („zbârcirea", membranei celulare, condensarea şi fragmentarea cromatinei). Un alt organism unicelular, *Tetrahymena termophila* [6] suferă

Scanned with OKEN Scanner

moarte celulară programată în cultură la o densitate sub 750 celule/ml; procesul s-ar datora scăderii concentraţiei unor „factori de creştere", sintetizaţi de către microorganism, sub un anumit prag de supravieţuire. La unele bacterii, care conţin gene plasmidice ce codifică toxine, moartea programată poate avea loc în anumite condiţii (privarea de nutrienţi, compuşi toxici etc.), iar scopul ei ar fi unul social: eliminarea unor indivizi slabi din competiţia pentru resurse nutritive.

Alte eucariote simple la care s-a evidenţiat apoptoza sunt *Trypanosoma brucei rhodensiense* şi *Dictyostelium discoideum* şi, departe de a fi o simplă curiozitate, moartea programată la unicelulare reconfigurează unele din întrebările noastre privind evoluţia ansamblurilor multicelulare şi a „instinctului" social în natură. Se consideră că apariţia organismelor multicelulare a fost rezultatul cooperării (comunicării) moleculare stabilite între celulele unor eucariote primitive. Forme rudimentare de comportament social (intermediate prin semnale solubile) ar exista prin urmare, din fazele cele mai timpurii ale istoriei biologice şi ar fi putut contribui în mod direct la dezvoltarea ansamblurilor macrocelulare.

O formă interesantă de moarte programată apare în culturile de celule prelevate de la eucariotele superioare. Astfel, fibroblaştii de mamifer în cultură, chiar dacă au toţi factorii nutritivi şi de creştere asiguraţi, după aproximativ 50 de diviziuni suferă moarte celulară programată. Acest program intern pare să fie o caracteristică de specie coordonată de genele de control temporal *(clock genes),* numărul de diviziuni fiind cu atât mai mic cu cât durata de viaţă a indivizilor din acea specie este mai mică.

Merită aici menţionată şi ipoteza catastrofei erorilor avansată de L. Orgel (1973). Conform acestei teorii, mutaţiile survenite în genele care codifică enzime implicate în procesele de translaţie, transcripţie şi, în special, replicare, vor micşora, în general, precizia acestor procese. Rezultatul este o mărire a probabilităţii de apariţie a unor enzime defectuoase, inclusiv a celor implicate în replicarea materialului genetic, mărind astfel şansa apariţiei unor mutaţii în ciclul următor. În lipsa unui proces de selecţie a celulelor nealterate genetic, procesul de scădere a preciziei sintezei biomacromoleculelor se autoamplifică; numărul de mutaţii per celulă va creşte exponenţial şi va duce, în cele din urmă, la moartea celulelor.

Mecanismele morţii celulare programate: veriga extracelulară

Dintre semnalele externe cu rol în moartea programată, unii hormoni şi factori de creştere au un rol bine definit. La *Drosophila,* în anumite faze ale morfogenezei, ecdisonul (un hormon steroid) induce moartea programată a neuronilor care exprimă izoforma EcR–A a receptorului hormonului ecdisonic [2]. La mamifere, un exemplu similar este inducerea morţii programate a celulelor secretoare în prostată

Scanned with OKEN Scanner

de către testosteron. Unele molecule steroidice (glucocorticoizii în doze moderate) şi acidul 9–*cis* retinoic antagonizează însă apoptoza printr-un mecanism neexplicat.

În continuare este prezentat „Arborele filogenetic" al morţii celulare programate. În cursiv sunt figurate speciile la care moartea apoptotică s-a evidenţiat cu certitudine (după [4]):

***Animale multicelulare/plante multicelulare* (700 de milioane de ani în urmă)**

fungi — **diatomee**
cromofite
oomicete
***ciliate* (un miliard de ani în urmă)**
dinoflagelate

alge roşii
mucegaiuri de nămol
entamoebae
amoebae

***kinetoplastide* (2 ÷ 1,5 miliarde de ani în urmă)**
euglenoide

tricomonidae
microsporidieni
diplomonidae
***eubacterii*/arhebacterii (3,5 ÷ 2 miliarde de ani în urmă)**

Figura 2

Ligandul Fas este un alt exemplu de semnal extern proapoptotic. Aceasta este o moleculă de 40 kDa din familia TNF, a cărei expresie este indusă pe calea complexului TCR–CD3. El leagă molecula Fas (CD95), un receptor membranar din familia TNF–R, şi induce rapid şi susţinut moartea programată în celulele care îl posedă. În porţiunea citosolică receptorul Fas posedă un domeniu de omologie prezent şi în receptorul TNF–α de 55 kDa, numit „domeniul morţii". Sinteza FasL de către limfocitele T citotoxice (CTL) şi legarea sa ulterioară de receptorul Fas de pe suprafaţa celulelor ţintă este unul dintre mecanismele prin care aceste celule, fie ele canceroase, infectate cu virus sau nonself (în cazul transplantului) sunt distruse.

Există două modele animale la care s-a studiat funcţia Fas şi FasL: şoarecele *lpr*, în care este inactivată gena Fas şi şoarecele *gdl*, „knock-out" pentru gena FasL. Ambele modele se caracterizează printr-o apoptoză ineficientă, cu supravieţuirea unor clone autoimune care determină un fenotip asemănător lupusului eritematos (LES) la om. Deşi pacienţii cu LES nu prezintă modificări evidente în genele Fas şi

Scanned with OKEN Scanner

FasL, în unele cazuri s-a detectat o formă solubilă de ligand Fas, care ar interfera funcţia moleculei membranare [3].

Se cunosc şi semnale extracelulare care protejează celulele împotriva morţii apoptotice. De exemplu, factorul de creştere fibroblastic bFGF împiedică moartea indusă de radiaţii a endoteliului vascular, care altfel este susceptibil la doze mici de radiaţii. TGF–1, deşi nu este un factor proapoptotic *per se,* blochează proliferarea anumitor tipuri celulare de mamifer, în general de origine mezenchimală (fibroblaşti, limfocite). Analogul său de la *Drosophila* (codificat de gena *decapentaplegic, dpp)* acţionează însă ca un factor de supravieţuire difuzibil, care împiedică moartea celulară în anumite ţesuturi. Rolul său antiapoptotic a fost evidenţiat la forme mutante pentru gena *dpp,* în care are loc moartea celulară ectopică, necontrolată, în diferite ţesuturi.

În anumite condiţii, chiar şi interacţia Fas–FasL poate induce activare celulară în loc de moarte programată. Astfel, fixarea Fas, exprimat pe membrana unor limfocite T din sângele periferic, cu anticorpi monoclonali sau FasL recombinat, în condiţiile unei stimulări suboptimale *via* TCR–CD3, potenţează proliferarea celulelor T, cu creşterea expresiei CD69, CD25 şi a sintezei de IL–2, IFN–γ şi TNF[7].

Un model intrigant de moarte celulară programată a fost observat pentru celulele din sângele periferic, consecutiv internalizării unor oligonucleotide sau fragmente DNA exogene. Această internalizare are loc în urma interacţiei secvenţelor DNA oligonucleotidice cu receptori pentru fragmente DNA exprimaţi pe suprafaţa celulară. Au fost evidenţiate mai multe astfel de molecule receptor, de 30, 66 şi 69 kDa, exprimate pe suprafaţa unor celule mononucleare şi linii de limfom T [8]. Internalizarea este urmată de blocarea ciclului celular în faza G_0 sau G_1 şi de moartea celulară, care s-a demonstrat a fi apoptotică. Mecanismul în detaliu este necunoscut, deşi ar putea implica o cale similară cu cea indusă de virusurile care infectează celula eucariotă. DNA exogen ar putea modifica/altera mesajul genetic original al celulei, într-o aşa manieră, încât celula ţintă s-ar „îmbolnăvi" sau ar suferi transformarea malignă. Astfel, existenţa unor receptori pentru DNA pe suprafaţa mononuclearelor le-ar investi cu funcţia de gardian care apără integritatea genetică a organismului. O aceeaşi semnificaţie ar avea existenţa primordială a autoanticorpilor naturali anti–DNA şi conservarea evolutivă înaltă a unor secvenţe variabile VH cu rol în asamblarea acestor anticorpi. Aceasta demonstrează că secvenţele DNA exogene străine sau derivate din celulele străine ori derivate din cele omologe alterate nu sunt un antigen „indiferent" ci unul potenţial periculos, a cărui acţiune trebuie anihilată.

O moarte apoptotică asemănătoare a fost evidenţiată în celulele mononucleare şi în urma internalizării unor autoanticorpi mediată de receptori Fc sau prin ribonucleoproteine (RNP) de suprafaţa celulară.

Scanned with OKEN Scanner

Veriga intracelulară

Radiaţiile ionizante pot induce moartea celulară programată de tip apoptotic, atât în celulele care proliferează intens, cât şi în cele aflate în faza G_0. Leziunile DNA care apar în urma iradierii induc, *via* protein-kinaze DNA dependente, proteina p53 care, la rândul ei, activează genele GADD şi blochează derularea ciclului celular.

Se poate observa, în figura 3, rolul proteinei p53 în derularea programului apoptotic. Leziuni survenite în catena DNA induc proteina p53 care, la rândul ei, stimulează expresia proteinelor MDM2, GADD şi p21. Acestea blochează derularea ciclului celular până când leziunile DNA sunt reparate. În cazul în care leziunile persistă are loc apoptoza.

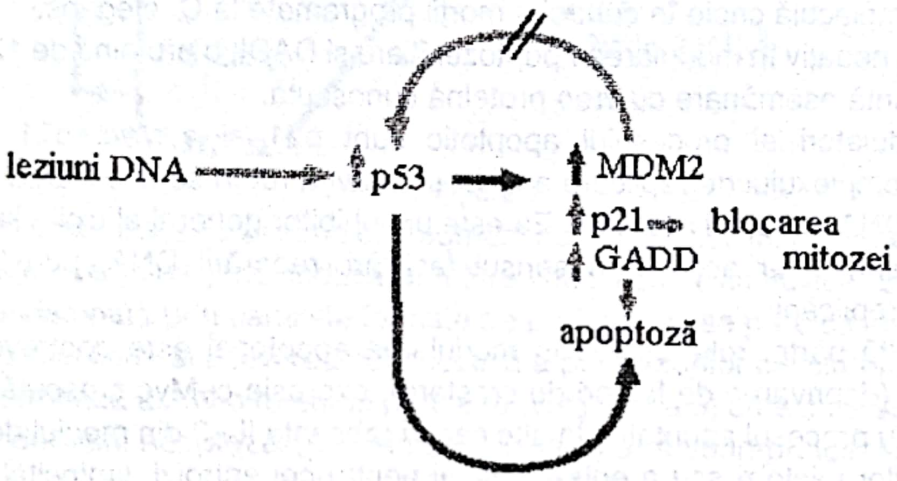


Figura 3

p53 este o proteină de control a ciclului celular şi nu permite înaintarea acestuia în cazul în care apar leziuni DNA (mai ales dublu-catenare) sau porţiuni DNA nereplicate. Ea nu activează din start programul apoptotic ci acordă o şansă celulei prin inducerea mecanismelor de reparare DNA; numai după ce sistemele de reparare şi-au dovedit ineficienţa iar leziunile continuă să persiste este declanşat programul letal. „Scopul" morţii celulare în acest caz este evident: împiedicarea apariţiei în urma unor mutaţii DNA necontrolate a unor clone canceroase care ar periclita supravieţuirea ansamblului multicelular din care fac parte. Altruismul în natură are, în consecinţă, forme de manifestare variate.

O cale majoră de semnalizare intracelulară proapoptotică a fost descoperită la *Drosophila* şi are ca figurant principal, produsul genei *reaper* [2]. Mutaţiile în această genă blochează moartea programată în numeroase ţesuturi iar expresia ei sub controlul unui promotor de şoc termic hsp 70 induce apoptoza ectopică. În plus, calea de semnalizare prin reaper este interferată de proteina antiapoptotică p53

Scanned with OKEN Scanner

codificată de baculovirusuri. Reaper are 65 de aminoacizi şi nu prezintă omologie cu vreo proteină existentă în baza de date.

Unul dintre modulatorii binecunoscuţi ai procesului apoptotic, cel puţin în celulele de mamifer, este proteina bcl–2 şi omologii săi. Aceştia formează o familie de proteine cu masa moleculară de 25 -- 26 kDa. Bcl–2 are o localizare strategică fiind inserată prin coada citoplasmatică în membrana celulară, mitocondrială externă şi a reticulului endoplasmic şi blochează apoptoza indusă de diverşi factori. Bcl–2 acţionează în complexe heterodimerice cu alte molecule din aceeaşi familie (Bax, Bcl–x_s) şi ar împiedica moartea apoptotică prin interferarea influxului de Ca^{2+} sau prin limitarea producţiei de radicali liberi ai oxigenului. Bcl–2 poate forma complexe şi cu alte proteine – Nipl–3, kinaza Raf şi R–Ras, fără a se cunoaşte rolul lor. Importanţa Bcl–2 în procesul apoptotic este dovedită şi prin omologia ei mare cu CED9, o moleculă cheie în controlul morţii programate la C. elegans.

Un efect negativ în modularea apoptozei îl are şi DADI, o proteină de 12,5 kDa, care nu prezintă asemănare cu vreo proteină cunoscută.

Alţi modulatori ai procesului apoptotic sunt p21 şi c–Myc. p21 intră în compoziţia complexului de replicare a DNA şi ar avea rol în semnalizarea apariţiei unor leziuni DNA în cursul replicării. Ea este un inhibitor general al ciclin-kinazelor, p53–dependent, şi ar acţiona în sensul facilitării reparării DNA, prin blocarea temporară a replicării.

Pe de altă parte, rolul c–Myc în modularea apoptozei este controversat. În unele situaţii (deprivarea de factori de creştere), expresia c–Myc crescută se asociază direct cu procesul apoptotic. În alte cazuri (absenţa IL–3 din mediul de cultură al progenitorilor mieloizi sau a eritropoietinei pentru cei eritroizi, limfocitele tratate cu dexametazonă), apoptoza se corelează direct cu reducerea expresiei c–Myc.

Scăderea expresiei anti-oncoproteinei Rb–1 modulează, de asemenea, pozitiv apoptoza, un efect analog fiind obţinut şi în prezenţa proteinelor virale E1B (adenovirusuri) sau E7 (codificată de papilomavirusul uman HPV–16), care fixează şi sechestrează Rb–1.

Veriga efectoare

„Calea finală comună" în moartea apoptotică este activarea unor enzime litice care autodistrug, fragmentează, celula. Aceste enzime sunt – nucleaze care clivează cromatina nucleară internucleozomal şi determină apariţia „scării nucleozomale" (o succesiune de oligomeri nucleozomali) – şi proteaze – în general serin - şi cistein - proteaze.

Cistein-proteazele au captat puternic atenţia în ultimii ani prin descoperirea omologiei izbitoare dintre Ced3 (de la *C. elegans)* şi convertaza precursorului interleukinei IL–1β (ICE, Interleukin Converting Enzyme). De fapt ICE face parte dintr-o

Scanned with OKEN Scanner

familie de molecule înrudite (alături de Ich–1, prICE, CPP32 etc.) care acţionează asupra unor variate substructuri celulare: poli (ADP-riboz) polimeraza-PARP, topoizomeraze, histona H1, fosfolipaza A2, protein-kinaza Cβ, lamina nucleară B, β-actina, fodrina, APC etc. [9]. Clivarea acestor substraturi ar fi responsabilă pentru colapsul morfologic şi funcţional al celulelor destinate să moară (vezi figura 4).

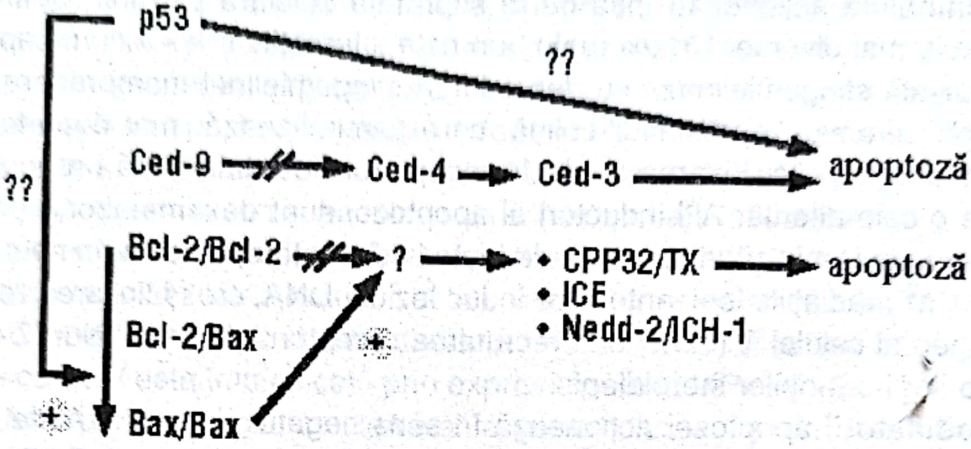


Figura 4

Serin-proteazele (granzimele, fragmentinele) au fost incriminate în moartea apoptotică a celulelor ţintă, indusă de către limfocitele T citotoxice. Ele pătrund în celula condamnată prin canalele formate de perforine şi se pare că acţionează prin clivarea proteolitică şi activarea consecutivă a precursorilor cistein-proteazelor.

Se formează astfel o reţea de proteaze (vezi figura 5) care intră succesiv în joc în cursul derulării apoptozei [9]. Primele (clasa 1) ar fi serin-proteazele din clasele 3A şi 3B, în care a fost inclusă CPP32 (YAMA/apopaina). Fiecare din aceste proteaze poate avea diferite substraturi celulare, prin acţiunea lor coordonată, fiind dezasamblată celula.

Intrarea succesivă în funcţie a proteazelor cu rol în moartea apoptotică:

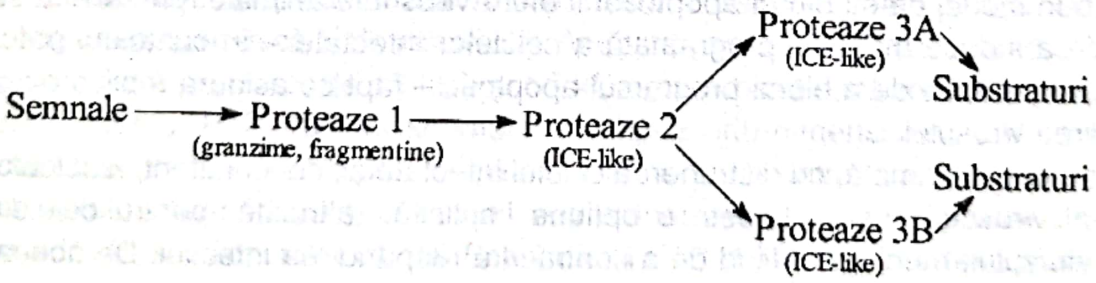


Figura 5

Substraturile sunt diverse proteine intracelulare: PARP, topoizomeraze, histona 1, protein-kinaza Cβ, fosfolipaza A2 APC (Adenomatous Polyposis Coli), lamina B, β–actina, fodrina iar pentru CPP32 şi proteinele SREBP–1 şi SREBP–2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein) (după [9]).

Scanned with OKEN Scanner

Un tablou sinoptic al apoptozei

Moartea apoptotică se pretează destul de bine la o stadializare temporală, prin intrarea succesivă în rol a *semnalelor, modulatorilor* şi a *efectorilor* care desăvârşesc programul letal (vezi figura 4).

Semnalele acţionează încă de la suprafaţa celulară sau intracelular şi sunt dintre cele mai diverse. Un exemplu bun este interacţia TNF–α cu receptorul său: este activată sfingomielinaza cu degradarea sfingomielinei membranare şi producerea de ceramide şi fosfatidil-colină, care semnalizează, mai departe, iniţierea procesului apoptotic. Fixarea FasL de receptorul Fas determină un acelaşi efect, deşi pe o cale diferită. Alţi inductori ai apoptozei sunt dexametazona (în limfocite sau precursorii limfoizi), deprivarea de factori de creştere, hipoxia (în neuroni), ionoforii de Ca^{2+}, radiaţiile ionizante care induc leziuni DNA, cross-linkarea receptorului de antigen al celulei T (TCR) sau recrutarea receptorului „orfan" Nur77 din familia receptorilor hormonilor steroidieni.

Modulatorii apoptozei acţionează în sens negativ şi pozitiv. Astfel, inhibitorii sunt Bcl–2 şi proteinele înrudite (inclusiv CED9 de la *C. elegans),* DAD1, iar dintre stimulatori sunt p53 şi proteina Reaper de la *Drosophila.* Alte molecule (p21, c-Myc şi Rb-1) au efect ambiguu şi induc sau blochează moartea apoptotică în funcţie de condiţiile intracelulare şi semnalele primite din afara celulei.

Efectorii sunt de natură enzimatică. Nucleazele degradează cromatina nucleară iar proteazele intră secvenţial în funcţie şi acţionează pe substraturi proteice diverse. Ei dezmembrează celula în corpi apoptotici care, mai departe, sunt ingeraţi de către fagocite.

Rolul virusurilor în apoptoză [10]

Un bun model de studiu al apoptozei îl oferă virusurile animale, prin abilitatea lor, fie de a induce moartea programată a celulelor infectate – în contextul patogenezei virale –, fie de a bloca programul apoptotic – fapt ce asigură replicarea şi răspândirea virusului.

Moartea programată, cu distrugerea celulei infectate şi, concomitent, a acidului nucleic al virusului infectant, este o opţiune implicită, „altruistă" pentru celulele expuse virusului, menirea ei fiind de a contracara răspândirea infecţiei. De aceea, numeroase virusuri şi-au dezvoltat mecanisme prin care împiedică apoptoza celulelor pe care le infectează şi îşi prelungesc astfel starea de latenţă sau îşi completează ciclul de replicare. Faptul că unele virusuri omoară celula pare mai degrabă un accident (cazul HIV, al virusului Moloney al leucemiei murine), deşi, uneori, ar putea fi o condiţie necesară pentru supravieţuirea virusului. Moartea programată în acest caz este apoptotică, fapt demonstrat şi de blocarea efectului

Scanned with OKEN Scanner

citocid al unor virusuri (Sindbis, gripal, al choriomeningitei limfocitare etc.) prin expresia Bcl-2.

O ameninţare pentru supravieţuirea şi multiplicarea virusului este şi răspunsul imun defensiv iniţiat împotriva celulelor care arborează antigene virale şi care sunt distruse printr-un mecanism apoptotic „specificat extern". Preocuparea virusului de a interfera răspunsul imun are, prin urmare, suport şi, în general, cu cât genomul unui virus este mai mare, cu atât este mai mare şi probabilitatea de a conţine gene „de lux", neesenţiale pentru replicare dar necesare pentru blocarea răspunsului imun sau interferarea apoptozei induse endogen. Ne vom referi, pe scurt, doar la ultimele, acestea fiind mai bine cunoscute la virusul Epstein Barr (EBV), cowpoxvirusuri, adenovirusuri şi baculovirusuri (virusuri ale insectelor).

EBV poate supravieţui mulţi ani în stare de latenţă în limfocitele B şi, de aceea, trebuie să asigure viabilitatea acestor celule care, cu excepţia cazului în care nu sunt celule cu memorie, au o durată de viaţă relativ scurtă. Moartea apoptotică a LB infectate cu EBV este împiedicată prin expresia genei LMP–1 (Latent Membrane Protein–1), localizată în regiunea „tardivă" a genomului, activă în cursul fazei de latenţă. LMP–1 stimulează expresia Bcl–2, cel mai probabil acesta fiind mecanismul prin care este interferată apoptoza. Un alt produs genic viral (BHRF1) prezintă o uşoară omologie cu Bcl–2 şi este, în aparenţă, necesar tranziţiei de la faza de replicare activă la cea de latenţă a virusului.

Spre deosebire de EBV, care acţionează pe veriga modulatoare, ***cowpoxvirusurile*** întrerup veriga efectoare a apoptozei. Aceste efect se datorează unei serpine codificate de gena crmA. Ea inhibă specific activitatea cisteinproteazelor de tipul ICE (grupul 2) şi activarea consecutivă a celorlalte tipuri de proteaze. Prin această acţiune este vizată, mai degrabă, activitatea granzimelor, serin-proteaze secretate de limfocitele T citotoxice dezvoltate împotriva celulelor infectate cu cowpoxvirusuri, care activează ICE prin clivarea precursoului său.

Efectul anti-apoptotic al ***adenovirusurilor*** a fost descoperit pe forme mutante cu regiunea genomică E1B inactivată. Această regiune codifică, în cadre de citire diferite, două proteine, de 19 kDa şi 55 kDa, care blochează moartea programată pe căi diferite. E1B–19 kDa seamănă cu Bcl–2 prin dimensiunea aproximativă şi localizarea sa pe membrana nucleară, membranele intracelulare, precum şi pe filamentele intermediare şi ar putea avea o aceeaşi funcţie ca şi proteina celulară. Într-adevăr, s-a constatat că atât Bcl–2 cât şi E1B–19 kDa convertesc proteina p53 dintr-un represor într-un activator transcripţional, astfel că, gene care în mod normal ar trebui să fie „stinse" sunt active. E1B–55 kDa acţionează prin legarea directă de p53 şi se aseamănă din acest punct de vedere cu alte proteine virale (E6 de la HPV, TL de la SV40) sau ale gazdei. De remarcat că celulele infectate cu virusuri defective pentru E1B suferă rapid apoptoza. Efectul s-ar atribui unei regiuni genomice (E1A) care codifică o proteină ce stimulează proliferarea celulară;

Scanned with OKEN Scanner

aceasta, pe de-o parte, induce intrarea în faza S iar pe de altă parte, stabilizează proteina p53, adică lansează două semnale contradictorii: apoptoză – anti-apoptoză. Rolul E1B ar fi tocmai de a înclina balanţa de partea mecanismelor anti-apoptotice. Adenovirusurile pot interfera şi moartea indusă exogen, prin produsul genic E3 gp 19 kDa care inhibă acţiunea limfocitelor citotoxice, şi prin alţi produşi ai regiunii E3, care împiedică efectele citocide ale factorilor de necroză tumorală.

Dintre ***baculovirusuri,*** cel mai reprezentativ în materie de dispozitive anti-apoptotice este virusul polihedrozei nucleare de la *Autographa californica.* Acest virus codifică o proteină, p35, cu localizare citosolică, care inhibă moartea prematură a celulelor infectate. Mecanismul pare să fie diferit de cel mediat de Bcl–2.

Alte baculovirusuri codifică IAP (inhibitor of apoptosis), un produs genic al cărui efect de inhibiţie a morţii celulare programate nu se suprapune cu cel al p35.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Kerr JFR (1995) Neglected oportunities in apoptosis. *Trends Cell Biol.*, **5**:74.

2. White K., Steller H (1995) The control of apoptosis in *Drosophila, Trends Cell Biol.*, 5:74.

3. Wyllie AH (1995) The genetic regulation of apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**:97.

4. Ameisen JC (1996) The origin of programmed cell death. *Science,* **272**:1278.

5. Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O (1995) Apoptosis in a unicellular eukaryote *(Trypanosoma cruzi):* implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ,* **2**:285.

6. Christensen ST, Wheatley DN, Rasmussen MI (1995) Mechanisms controlling death, survival and proliferation in a model unicellular eukaryote *Tetrahymena termophila. Cell Death Differ,* **2**:301.

7. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR (1995) Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol. Today,* **16**:569.

8. Alarcon-Segovia D., Ruiz-Arguells A., Llorente L. (1996) Broken dogma: penetration of autoantibodies into living cells. *Immunol. Today,* **17**:163.

9. Kumar S., Harvey NL (1995) Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death. *FEBS Letters,* **375**:169.

10. Shen Y., Shenk T.E. (1995) Viruses and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**:105.

Scanned with OKEN Scanner

APLICAŢII ALE BIOLOGIEI MOLECULARE: TERAPIA GENICĂ

C. A. ŢAŢU şi O. SÂRBU

Tratamentul eficace al bolilor genetice necesită atât diagnosticul precis al leziunii, intervenţia terapeutică precoce – înaintea apariţiei leziunilor tisulare ireversibile –, cât şi înţelegerea aspectelor fiziopatologice ale afecţiunii. Terapiile moderne implică abordări complexe: ● tratamentul manifestărilor clinice, farmacologic (beta-blocante în sindromul Marfan) sau chirurgical (reconstrucţia facială în sindromul Treacher-Collins*) ● tratament la nivel metabolic, implicând restricţii alimentare (în intoleranţa ereditară la fructoză, deficitul de lactază), utilizarea inhibitorilor metabolici (guta, hipercolesterolemia familială) sau înlocuirea produşilor metabolici deficienţi (în guşa familială, deficienţa de biotinidază) etc. ● transplantul de organe (măduvă hematogenă, ficat, rinichi) ● activarea expresiei unor gene endogene (activarea expresiei genelor globinice fetale cu ajutorul hidroxiureei) ● terapia genică (definită ca transferul de material genetic nou în celulele somatice sau germinale ale unui pacient).

În cazul terapiei genice germinale DNA-ul exogen este introdus în zigotul sau embrionul tânăr, urmărindu-se transmiterea efectului şi la generaţia următoare de indivizi. Tehnica a fost aplicată până, în prezent, doar pe şoareci iar rezultatele sunt promiţătoare (au fost tratate o serie de afecţiuni genetice ca deficitul de STH, β-globină, proteină bazică mielinică). Riscul major este reprezentat de mutageneza inserţională (alterarea unei gene rezidente în urma inserţiei la întâmplare a DNA-ului exogen), astfel că metoda nu este aplicabilă la om.

Metodele de terapie genică somatică diferă în funcţie de afecţiunea în cauză, celulele ţintă (celule stem din măduvă hematogenă, hepatocite, endoteliocite, fibroblaste, mioblaste, celule epiteliale) şi de tipul de vector de transfecţie. Majoritatea

---

* *Sindromul Treacher-Collins (Sindrom Franceschetti sau disostoza mandibulofacială) asociază: fante palpebrale cu dispoziţie animongoloidiană + ptoză palpebrală, coloboma, microftalmie + hipoplazie malară şi mandibulară + macrostomie cu malocluzie + deformări ale pavilioanelor şi afectarea urechii interne şi medii.*

Scanned with OKEN Scanner

acestora implică manipularea *in vitro* a celulelor, fiind necesară extragerea celulelor ţintă din organism, transferarea şi multiplicarea lor într-un mediu de cultură. Ulterior ele sunt transfectate cu un vector recombinat şi sunt reintroduse în organism. Tendinţa actuală este de înlocuire a tehnicii *in vitro* cu metode *in vivo,* mai facile şi mai puţin costisitoare.

Primul tratament autorizat de acest tip datează din 1990, implicând gena adenozindeaminazei (ADA), indispensabilă unei funcţionări normale a sistemului imun. De atunci, au fost conduse peste 100 de studii clinice în domeniul terapiei genice, cuprinzând afecţiuni ereditare, cancerul şi AIDS.

Totuşi, deşi impactul acestei noi terapii a fost remarcabil, până în prezent nu există dovezi certe asupra unor rezultate absolut benefice. Cu toate că primul pacient care a dispus de acest tratament a evoluat favorabil, nu s-a putut preciza dacă aceasta se datorează genei inserate sau tratamentului convenţional (ADA sintetică) care s-a administrat concomitent [2].

Cel mai frecvent utilizate strategii de terapie genică somatică folosesc:

● cDNA inserat sub controlul unui promotor străin ● „minigene" artificiale (insertul de DNA include secvenţele genomice necesare reglării nivelului expresiei şi specificităţii tisulare a genei în cauză) ● metode de recombinare situs-specifică (se urmăreşte înlocuirea genei mutante cu secvenţa genomică normală).

Se descriu două mari sisteme de transfer genic: ● virale – adenovirusuri, virusuri asociate adenovirusurilor (AAV), retrovirusuri, etc. ● non-virale – liposomi, conjugate DNA–proteină, „naked DNA" (DNA disociat de proteinele de care este legat în mod natural).

Genomul **retrovirusurilor** este constituit dintr-o singură catenă de RNA şi conţine gene ce codifică proteinele capsidice (gag), reverstranscriptaza (pol), glicoproteinele anvelopei (env). După ce pătrund în celulă, matriţa de RNA viral este copiată cu ajutorul unei revers-transcriptaze (DNA-polimerază RNA dependentă). DNA-ul viral este ulterior integrat în genomul celulei ţintă prin intermediul capetelor sale specializate LTR (Long Terminal Repeats), constituind provirusul. Secvenţele LTR sunt polifuncţionale, conţinând secvenţe promotor, enhancer şi semnale de poliadenilare. Vectorii retrovirali realizează integrarea permanentă a DNA-ului exogen (max. 7 kb) în genomul celulei ţintă, astfel încât informaţia genetică nou introdusă se transmite cu fiecare diviziune a celulei. Cel mai frecvent folosit este virusul leucemiei murine (MLV). Metoda se aplică însă doar celulelor în diviziune şi necesită (pentru o transfecţie eficientă a celulelor ţintă) o concentraţie de vectori retrovirali greu de obţinut.

Principalele avantaje ale folosirii **vectorilor adenovirali** sunt gama largă de aplicabilitate (poate infecta numeroase tipuri de celule, atât în diviziune cât şi în repaus), posibilitatea obţinerii de titruri mari de vectori şi, mai ales, siguranţa (a fost utilizat ca vaccin în epidemii respiratorii şi gastroenterite).

Scanned with OKEN Scanner

Genomul adenovirusului este de aproximativ 36 kb şi este acoperit fizic de învelişul viral astfel că nu mai rămâne spaţiu pentru adăugarea de material genetic suplimentar. Totuşi, se poate crea o breşă prin înlocuirea unei porţiuni din genomul viral; de exemplu, eliminarea genei E1 (indispensabilă pentru capacitatea infectantă a virusului) furnizează un „spaţiu" de 3,2 kb iar cea a genei E3 (cu rol în protejarea virusului faţă de răspunsul imun al gazdei) de 4,3 kb. Putem astfel dispune de un spaţiu de 7,5 kb pentru inserţia unei gene străine; produsul genei E1 poate fi furnizat adenovirusului inginerizat de către celulele embrionare renale umane din linia 293 (care conţin inserată în genom gena E1). Riscul eliminării E3 este declanşarea unui puternic răspuns imun al organismului faţă de infecţia virală.

Limitările metodei sunt date de posibilitatea apariţiei formelor de virus capabile de replicare (RCV = Replication Competent Virus) cu potenţial patogen şi perenitatea expresiei.

Virusurile asociate adenovirusului sunt mai puţin utilizate; pentru parcurgerea ciclului celular ele au nevoie de proteine furnizate de alte virusuri. Avantajul faţă de adenovirusuri este dat de capacitatea de a se integra (în unele situaţii) în genomul celulei ţintă, răspunzătoare fiind o proteină codificată de gena *rep.* Dezavantajul este reprezentat de spaţiul maxim destul de restrâns pentru inserarea unei gene străine (aproximativ 4,5 kb).

Un alt virus care tinde să fie implicat în terapia genică este SV40 (Simian Virus 40). Acesta este un virus foarte oncogen care produce un antigen T de dimensiuni mari care leagă proteinele p53 şi Rb. Gena Rb codifică o fosfoproteină nucleară de 105 kDa; forma nefosforilată (activă) predomină în faza G_1 a ciclului celular şi formează complexe cu factorul de transcripţie E2F. Proteina Rb este progresiv fosforilată în faza S a ciclului celular, inactivându-se şi eliberând factorul E2F. Antigenul (oncoproteina) T a virusului SV40, E1A a adenovirusului şi E7 a virusului papiloma uman leagă proteina Rb şi induc transformarea neoplazică.

Mutaţia genei p53 este cel mai fecvent implicată în cancerogeneză. Produsul genei p53 leagă antigenul T (SV40), E1B (adenovirus) şi E6 (papiloma-virus). Proteina p53 se leagă şi de alte proteine celulare endogene (Hsp70, mdm2) precum şi de DNA. Este cea mai importantă „DNA" binding proteină cunoscută a fi implicată în reglarea ciclului celular. Proprietăţile proteinei T pot fi utilizate pentru replicarea extracromozomială a unui vector episomal într-o celulă, cu condiţia modificării prin mutaţii a situsurilor de legare de proteinele genelor p53 şi Rb.

Tehnologia antisens

Un procedeu mai recent de inserare a unor gene străine se bazează pe folosirea lipozomilor ce conţin cDNA sau RNA antisens. Modelul bacteriilor care au descoperit reglarea genică prin intermediul RNA-ului antisens cu milioane de ani în

Scanned with OKEN Scanner

urmă şi au aplicat-o la nivelul promotorilor pentru reglarea numărului de copii de plasmide şi de proteine membranare dintr-o celulă, a inspirat cercetătorii [15]; ei au sesizat numeroase avantaje în folosirea acestei tehnici, cum ar fi: afinitatea crescută a oligonucleotidelor antisens pentru ţintă şi evitarea riscului unei reacţii alergice sau imune.

Totuşi, aplicarea procedeului la celule eucariote s-a dovedit dificil, incluzând probleme comune terapiei genice (livrarea materialului genetic celulei ţintă, nivelul de expresie al genei antisens), dar şi impedimente specifice: cerinţa unui exces molar de molecule antisens faţă de RNA-ul endogen şi regăsirea acestora în compartimentul subcelular adecvat [16].

Inhibiţia antisens poate decurge prin două mecanisme: fie inhibarea directă a translaţiei, splicingului şi/sau a transportului nuclear, fie degradarea heteroduplexurilor RNA – DNA nemodificate, prin enzime care clivează helixuri duble, cum este RN-aza H [17] care taie RNA-ul dintr-un duplex RNA – DNA. Compuşii fosforotioat sunt stimulatori puternici ai RNazeiH.

Rezultatele încurajatoare ale terapiei prin oligonucleotide antisens au fost comunicate atât în urma experienţelor *in vitro,* cât şi a celor efectuate pe animale. Unul dintre studii vizează factorul transcripţional NF–KB, care reglează răspunsul imun şi expresia unor citokine. În experiment s-a folosit un oligonucleotid antisens 3'–fosforotioat complementar subunităţii p65 a NF–KB. În comparaţie cu compusul sens, folosit drept control, produsul antisens a împiedicat legarea NF–KB de secvenţa ţintă şi a redus, astfel, expresia unor citokine ca IL–6. Injectat intraperitoneal la şoareci, compusul a inhibat aproape complet dezvoltarea celulelor tumorale implantate [18]. De asemenea, tratamentul antisens s-a soldat cu scăderea nivelului de RNA pentru p65.

Altă ţintă a terapiei antisens a fost gena *bcr–abl,* implicată în leucemia mieloidă cronică. În urma splicingului mRNA, gena poate genera diferiţi produşi, în funcţie de exonul implicat *(bcr2–abl2, bcr2–abl3).* Cu oligonucleotide fosforotioat faţă de joncţiunea *bcr2–abl2* s-a reuşit inhibarea specifică a unei linii celulare purtătoare a acestei gene [19]. Supravieţuirea şoarecilor SCID infectaţi cu linia celulară respectivă a crescut cu 30%, fiind prevenite, de asemenea, splenomegalia şi metastazele.

Un compus fosforotioat sintetizat faţă de gena *c–myb* a permis inhibarea dezvoltării unui melanom la şoareci.

Recent, au fost expuse trei mecanisme de inhibare a virusului HIV–1 cu ajutorul tehnologiei antisens. Primul, bazat pe oligodeoxinucleotide fosforotioat neîncapsulate, poate interfera cu formarea de sinciţii mediat de virus; compusul fosforotioat se leagă puternic de receptorul CD4 şi de proteina de înveliş a virusului, gp120. Al doilea constă în inhibarea de către fosforotioat a revers-transcripţiei RNA-ului viral în citoplasmă, dependent de secvenţă (probabil prin legarea directă

Scanned with OKEN Scanner

de revers-transcriptază). Al treilea procedeu foloseşte oligodeoxinucleotide nemodificate, încapsulate în lipozomi, care inhibă revers-transcripţia, dependent de secvenţă, prin legarea pe secvenţa ţintă a RNA-ului viral.

Una dintre complicaţiile frecvente în AIDS este sarcomul Kaposi. Apariţia acestui sarcom este dependentă de citokine ca IL–6 şi de factori de creştere ca bFGF (basic Fibroblast Growth Factor). Prin oligonucleotide antisens dirijate împotriva acestor doi factori s-a reuşit inhibarea proliferării celulare.

Perspectivele terapiei antisens sunt, în acelaşi timp, impresionante şi contradictorii. Oligonucleotidele au făcut promisiunea unui drog sensibil şi raţional; rămâne de văzut dacă ea va fi îndeplinită, pe baza numeroaselor avantaje pe care le deţine (flexibilitatea modificărilor chimice, interacţii minime cu majoritatea proteinelor, afinitate crescută şi specificitate pentru acizii nucleici, stabilitate *in vivo*, absenţa compuşilor de degradare toxici, sustragere faţă de degradarea în endozomi, sinteza accesibilă).

Vaccinuri DNA

Folosirea de „naked DNA" pentru vaccinuri se alătură procedeelor de transfer genic cu ajutorul vectorilor non-virali, oferind pentru diferite infecţii virale alternative faţă de tratamentele convenţionale.

Unul dintre avantajele acestui procedeu faţă de cele standard se reflectă în stimularea răspunsului imun. De multe ori vaccinurile obişnuite iniţiază un răspuns citotoxic insuficient faţă de anumite virusuri. Aceasta se explică prin preluarea antigenelor vaccinurilor clasice de către celule prin endocitoză şi, apoi, prezentarea lor preponderentă în asociere cu antigene MHC-II, favorizând un răspuns imun umoral. În schimb, vaccinurile bazate pe „naked DNA" determină sinteza endogenă a proteinelor antigenice, care vor intra astfel pe calea de prezentare în asociere cu molecule MHC–I, declanşând, în special, un atac citotoxic [20]. Deşi cele două căi de prezentare a antigenului nu sunt complet disjuncte, preferinţele induc deosebiri perceptibile între cele două tipuri de vaccinare.

Un exemplu de vaccin de tip „naked DNA" a fost conceput faţă de virusul gripal [21]. Gena acestui vaccin corespunde miezului nucleoproteic (core) al virusului şi este inserată într-un plasmid care va fi injectat ca atare în ţesutul animalului. Plasmidele nu se integrează în genomul celular, iar gena străină pe care o conţin va fi exprimată o dată cu celelalte gene ale gazdei. Vaccinurile „naked DNA" induc atât o imunitate umorală cât şi una celulară, dar efectul decisiv pentru eradicarea infecţiei este realizat de mecanismul citotoxic.

Pe lângă favorizarea expresiei antigenice în asociere cu moleculele MHC–I, efectul stimulator citotoxic al vaccinurilor DNA se poate explica şi prin durata mai mare de expunere la stimulul antigenic, precum şi prin contribuţia mai importantă a limfocitelor T helper.

Scanned with OKEN Scanner

Vaccinurile DNA deţin şi alte avantaje faţă de cele standard; ele utilizează antigene cu asemănare mai mare faţă de epitopii nativi (în condiţii obişnuite antigenele suferă modificări în cursul obţinerii tulpinilor atenuate sau moarte), siguranţa lor este mai mare (mai ales în cazul pacienţilor imunocompromişi), pot reduce numărul de vaccinări necesare la copii (un singur plasmid poate include gene de la diferiţi agenţi patogeni) şi se pot administra chiar pacienţilor cu unele infecţii cronice (virus hepatitic C sau B, HIV), infecţii parazitare, cancer [22].

Domenii de aplicaţie a terapiei genice

Dintre afecţiunile incluse, până în prezent, în teste clinice de terapie genică puţine vizează conceptul iniţial, de corectare a unei gene defecte. În schimb, predomină testele dedicate cancerului şi infecţiei cu HIV.

Bolile ereditare

Condiţia de bază pentru efectuarea unei terapii genice este cunoaşterea amănunţită a defectului genic subiacent afecţiunii. În prezent se încearcă tratarea unor boli ereditare având la bază un singur defect genic şi, în general, a celor care nu implică un control genic sofisticat la nivelul locusului respectiv.

În afara deficitului de ADA, boli ereditare ca fibroza chistică sau maladia Gaucher sunt supuse încercărilor de tratament pe această cale.

Fibroza chistică (mucoviscidoza) este o boală ereditară, letală în absenţa tratamentului, cauzată de un defect al genei *CFTR,* implicată în transportul ionului de clor. Sunt afectate, în special, celulele tractului respirator, efectul fiind o supraproducţie de mucus în plămâni şi un risc crescut de infecţii la acest nivel. Vectorul folosit în testele de până acum este adenovirusul (administrat sub formă de aerosoli), datorită tropismului sau pulmonar [23]; totuşi, el nu este soluţia ideală, dată fiind necesitatea unui tratament continuu, care, la un moment dat, ar risca declanşarea unui răspuns imun periculos.

Alte afecţiuni puse în discuţie pentru terapie genică [4] sunt:

– bolile sanguine ereditare, de exemplu *talasemii,* care implică modificări genice ale unor proteine din componenţa hemoglobinei; celulele-ţintă pentru transferul genic ar fi precursorii eritrocitari din măduva hematogenă;

– *hipercolesterolemia familială,* caracterizată printr-un deficit de receptori pentru fracţiunea LDL (low density lipoproteins) a lipoproteinelor, cu rol aterogen; celulele-ţintă vizate sunt celulele hepatice;

– *miodistrofia Duchènne,* boală inflamatorie evolutivă, cauzată de un defect al genei pentru distrofină (proteină musculară); modificarea genică va fi adusă celulelor musculare, în special, celor de tip embrionar.

Pentru terapia *cancerului* s-au imaginat diferite strategii, principalele testate fiind:

Scanned with OKEN Scanner

– inserarea în celulele tumorale a genei unei proteine (de exemplu IL–2), care să stimuleze sistemul imun împotriva celulelor tumorale;

– transfecţia celulelor neoplazice cu gena pentru timidin-kinaza herpes-virusului, care să le sensibilizeze faţă de ganciclovir;

– activarea de gene supresoare ale tumorii.

Prima tentativă se bazează pe folosirea celulelor tumorale modificate ca vaccinuri. Aceasta ar avea ca efect o producţie crescută de celule efectoare, care să distrugă celulele tumorale nemodificate.

Se ştie că răspunsul imun antitumoral este mult mai redus şi ineficient în comparaţie cu cel provocat de alte stimulări antigenice. Aceasta se datorează, în parte, faptului că limfocitele T menite să distrugă celulele tumorale fie direct, fie prin secreţie de citokine, nu sunt activate. Ele au fost tolerizate faţă de majoritatea antigenelor tumorii (antigene proprii organismului) sau antigenele recunoscute ca străine (specifice tumorii) nu declanşează o semnalizare eficientă.

De-a lungul timpului s-au elaborat mai multe explicaţii pentru imunogenicitatea redusă a celulelor tumorale, deşi neconvingătoare pe deplin.

S-a invocat inducerea toleranţei periferice de către antigenele tumorale care nu iniţiază semnale costimulatoare, generarea de formaţiuni neoplazice fără antigene specifice sau secreţia de factori inhibitori solubili (TGF–β, IL–10) de către celulele maligne. La acestea se adaugă reducerea expresiei moleculelor MHC, deci a prezentării antigenului de către celulele tumorale şi efecte ale celulelor supresoare.

Dintre citokinele implicate în activarea limfocitelor T, IL–2 deţine efectul cel mai puternic asupra proliferării şi diferenţierii lor în limfocite citotoxice.

Procedeul de inserare a genei pentru IL–2 în limfocitele T implică drept vector un retrovirus de tip MLV [24]. S-a arătat, pe animale, că provocarea unei secreţii crescute de IL–2 la nivel tumoral determină o încetinire în dezvoltarea tumorii şi o diferenţiere mai marcată a limfocitelor T în forme citotoxice.

Studiul cu IL–2, precum şi studii similare implicând citokine ca IL–4, IL–6, IL–7, IL–12, IFN–t şi GM–CSF au arătat că rejetarea tumorii se poate obţine prin variate răspunsuri imune, specifice şi nespecifice, care implică limfocite T, celule NK şi/sau granulocite [25].

Procedeul propus, bazat pe folosirea IL–2, se poate aplica şi în eliminarea micrometastazelor, prin generarea unor limfocite T de memorie cu viaţă lungă. Micrometastazele devin, în numeroase forme de cancer, problema principală, după extirparea tumorii primare. Dacă tentativa de reversie a supresiei răspunsului imun se adaugă rezecţiei tumorii şi se completează cu prevenirea metastazelor, se poate spera la îmbunătăţirea rezultatelor clinice.

O altă posibilitate ar fi ca celulele dendritice să prezinte antigene tumorale. Celulele dendritice pot fi extrase din monocite periferice, cultivate în mediu cu

Scanned with OKEN Scanner

GM–CSF şi IL–4 şi modificate cu virusuri recombinate, astfel încât să exprime gene tumorale specifice. Procedeul a fost aplicat în melanoame. Rămâne întrebarea dacă celulele dendritice vor stimula adecvat limfocite T citotoxice, care să se localizeze ulterior la nivelul tumorii.

O altă modalitate de tratament al melanomului malign s-a bazat pe utilizarea factorului de necroză tumorală, TNF. S-au izolat de la pacientul respectiv limfocite infiltrative tumorale (TIL, un tip special de limfocite), care au fost transfectate cu retrovirusuri ce conţineau gena pentru TNF (o proteină cu 157 aminoacizi, sintetizată şi eliberată în mod normal de macrofage şi cu rol important în apărarea imună faţă de substanţe străine şi în distrugerea celulelor tumorale). Procedeul urmăreşte transportul ţintit al TNF la nivelul tumorii, pe care să o elimine selectiv. Administrarea, ca atare, a TNF în circulaţie, în concentraţii care să nu pună în pericol pacientul, n-ar fi realizat efectul dorit asupra formaţiunii neoplazice.

Dintre genele care pot sensibiliza celulele unei tumori faţă de pro-droguri, cel mai des se apelează la timidin-kinaza herpesvirusului (HSV–TK), care transformă ganciclovirul în forma trifosfat, toxică. Procesul este însoţit, ca fenomen secundar, de distrugerea celulelor tumorale învecinate, explicată de studii *in vitro* prin trecerea metabolitului toxic, prin joncţiuni gap la celulele învecinate. Studiile *in vivo* dau altă explicaţie, şi anume, modificarea micromediului adiacent tumorii şi stimularea sistemului imun cu producere de citokine care mediază atacul asupra celulelor maligne.

Dintre studiile demarate în lupta cu HIV, unele testează exprimarea unor gene ale virusului *(env* şi *rev)* în anumite celule ale pacientului, pentru a iniţia un răspuns imun specific [2]. Se foloseşte un vector retroviral, care poate fi injectat *in vivo* (intramuscular) sau *ex vivo* (prin intermediul fibroblaştilor).

Altă idee este de a crea molecule „momeală" (decoy), care să imite proteinele virusului şi să disrupă acţiunea acestora.

De asemenea, s-a încercat şi expresia de către celulele infectate cu HIV a timidin-kinazei, care să le facă ţinta chemoterapiei.

Dificultăţi şi incidente în terapia genică

Rezultatele studiilor de până acum enunţă ca principale dificultăţi ale terapiei genice obţinerea integrării genei transfectate în genomul uman şi expresia ei în proporţie satisfăcătoare. Astfel, cu greu se obţine o rată de transfer genic de 1% în celulele stem, fără o cauză definită. În plus, chiar dacă gena este inserată, este posibil ca ea să nu mai fie activă în generaţia următoare de celule. Mărind rata transferului prin creşterea concentraţiei de vector sau prin administrări mai frecvente, poate fi stimulat un răspuns imun care să neutralizeze celulele modificate.

Scanned with OKEN Scanner

Situaţia ideală, în care gena transfectată s-ar integra în locul genei defecte, are loc rar la mamifere; totuşi, este încercată prin recombinare pe bază de omologie (asemănător celei din cursul meiozei). Se testează, în prezent, inserarea ţintită a unei gene printr-un procedeu numit *gene targeting.*

Dintre liniile celulare purtătoare de vector folosite, aproximativ 15% sunt pozitive pentru forma RCV, datorită recombinărilor apărute pe parcursul producerii vectorului. Riscul esenţial al acestor forme este declanşarea unui proces malign.

În concluzie, toţi vectorii folosiţi în prezent au deficienţe, ceea ce îi determină pe specialişti să afirme că vectorul ideal pentru acest procedeu nu a fost încă găsit.

Există, bineînţeles, numeroase probleme care ar trebui rezolvate înainte de introducerea terapiei genice pe scară largă. Probabil, această metodă nu va putea înlocui, ci va fi complementară celorlalte tratamente deja folosite. Totuşi, ea rămâne o terapie promiţătoare, mai ales pentru acele afecţiuni care, în prezent, nu dispun de mijloace eficiente de vindecare. Oricum, ea trebuie privită cu optimism, la fel ca orice altă cucerire medicală.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Morgan R. A., Anderson W. F. (1993) Human Gene Therapy. *Ann. Rev. Biochem.,* **62**:191

2. Marshall E. (1995) Gene Therapy's Growing Pains. *Science,* **269**:1050.

3. Singer M., Berg P. (1992) Gene und Genome, Akad. Verlag Spektrum.

4. Hermann D., Hermann G. (1991) Technik und medizinische Diagnostick, MTA Serie 6:752.

5. Rubin B. A., Rorke L. B. (1988) Adenovirus vaccines, W. B. Saunders.

6. Graham F. L., Smiley J., Russell W. C., Nairu R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, 1977. *J. Gen. Virol.,* **36**:59.

7. Wold W. S. M., Gooding L. R. (1991) Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus–cell interaction. *Virology,* **184**:1.

8. Carter B. J., Laughlin C. A. (1983) Adeno–associated Virus Defectiveness and the Helper Functions, Plenum Press.

9. Samulski R. J. (1991) Targeted integration of adeno–associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J,* **10**:3941.

10. Günzburg W. H., Salmons B. (1995) Virus vector desing in gene therapy. *Mol. Med. Today,* 1357–4310:410–417.

11. Peters G., Lee A. E., Dickinson C. (1986) Concerted activation of two potential proto–oncogenes in carcinomas induced by mouse mammary tumor virus. *Nature,* **320**:628.

12. Oldfield E. H. (1993) Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra–tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum. Gene. Ther.,* **4**;39.

Scanned with OKEN Scanner

13. Salmons B., Günzburg W. H. (1993) Targeting of retroviral vectors for gene therapy, *Hum. Gene. Ther.*, **4**:129.

14. Hodgson C., Collins M., Porter C. (1995) Gene Therapy, *Mol. Med. Today*, 1357–4310:396–398.

15. Murino E., Balbas P., Puente J. L., Bolivar F. (1994) Antisense overlapping reading frames in genes from bacteria to humans. *Nucleic Acids Res*, **22**:1903.

16. Heidenreich O., Kang S. H. , Xiux., Nerenberg M. (1995) *Mol. Med. Today* 1357–4310:128–133.

17. Stein C. A., Cheng Y. C. (1993) Antisense oligonucleotides as therapeutic agents – Is the bullet really magic? *Science*, **261**:1004.

18. Kitajima I. (1992) Ablation of transplanted HTLV–I tax–transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF–kB. *Science*, **258**:1792.

19. Skorski T. (1994) Suppression of Philadelphia leukemia cell growth in mice by BCR–ABL antisense oligodeoxinucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**:4504.

20. McDonnel W. M., Askari F. K. (1996) DNA Vaccines. *The New Engl. J. of Med.*, **334**:42.

21. Donnely J. J. (1995) Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nature Med.*, **1**:583.

22. Fyann E. F. (1995) DNA vaccines: a novel approach to immunization, *Intl. J. Immunopharmacol.*, **17**:79.

23. Crystal R. G. (1994) Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nature Genet.*, **8**:42.

24. Zier K., Gansbacher B., Salvadori S. (1996) Preventing abnormalities in signal transduction of T cells in cancer; the promise of cytokine gene therapy. *Immunol. Today*, **17**:39.

25. Colombo M. P., Florin G. (1993) *Immunol. Today* **15**:48.

Scanned with OKEN Scanner

DISCRIMINAREA SELF-NONSELF ÎN APĂRAREA IMUNITARĂ

Z. SIMON şi F. SCHNEIDER

Scurtă descriere generală a sistemului imunitar

Sistemul imunitar este un sistem foarte complex, a cărui menire este să distrugă agenţii patogeni, substanţe macromoleculare, toxice, străine, pătrunse în organism, cât şi celule ale propriului organism, devenite periculoase prin cancerizare, infecţii virale etc. Aceşti agenţi patogeni, substanţe macromoleculare, celule cancerizate, se comportă ca *antigen*, ca material străin (nonself) faţă de organismul gazdă şi sunt distruse în urma recunoaşterii ca străine de către componente ale sistemului imunitar. Această apărare imunitară are şi aspecte negative – pune probleme în acceptarea, tolerarea grefelor în transplant şi în cazul bolilor autoimune atacă componente (self) ale organismului gazdă [1].

Sistemul imunitar poate fi împărţit în două componente. *Imunitatea nespecifică* constă din mai multe tipuri celulare precum macrofagele, fagocitele neutrofile şi o serie de mesageri (citokine) secretate de unele tipuri celulare care duc la reacţii inflamatorii, chemoatracţia anumitor celule la locul infecţiei etc. Această imunitate nespecifică constituie o primă linie de apărare, care acţionează rapid în urma recunoaşterii unor structuri moleculare comune unor agenţi potenţial patogeni şi mult diferite de cele ale propriului organism [2]. Macrofagele, de exemplu, au pe suprafaţa lor receptori care recunosc secvenţe polizaharidice bazate pe manoză, frecvente pe suprafaţa celulelor bacteriene, dar care lipsesc pe suprafaţa celulelor mamiferelor. În urma recunoaşterii, macrofagul fagocitează particula (bacteria, uneori particule de suspensii ca hidroxidul de aluminiu etc) şi o distrugere prin enzime litice. Această imunitate nespecifică este augmentată prin cea specifică. De exemplu, bacterii cu anticorpi ataşaţi de grupări antigenice superficiale, în urma cuplării unor proteine din sistemul complement cu o grupare a anticorpului, sunt recunoscute şi fagocitate în mod preferenţial de către macrofage.

Imunitatea specifică este asigurată de limfocite B şi limfocite T care, prin receptorii de pe suprafaţa lor (BCR, respectiv TCR) recunosc *epitopi* – structuri moleculare ale unor antigene nonself, care pot fi similare cu structuri moleculare ale propriului organism.

Scanned with OKEN Scanner

Limfocitele B (LB) sunt baza imunității umorale. Anume, fiecare clonă de celule B (celule provenite de la un ancestor comun), în urma recunoașterii antigenului, într-o anumită fază de dezvoltare secretă anticorpi solubili (proteine din clasa imunoglobulinelor), care au același situs receptor pentru antigen ca și BCR-ul de pe suprafața respectivei clone B. Anticorpii solubili se leagă de antigen și induc diferite alte fenomene (de ex., fagocitoza) care lizează, distrug antigenul.

Limfocitele T (LT) sunt baza *imunității celulare.* Ele sunt de mai multe tipuri, dintre care amintim numai câteva. Celulele helper (TH) intervin în activarea, prin antigen, a LB și a altor tipuri de LT. Celulele citolitice (CTL) distrug celulele pe a căror suprafață recunosc un antigen. Celulele natural ucigașe (NK) distrug, pare-se, celulele care pierd de pe suprafața lor o structură moleculară altfel omni-prezentă (molecule MHC clasa I) [3]. Și LT apar în clone de celule, toate cu același TCR pe suprafața lor. Limfocitele T recunosc drept antigen complexe între molecule MHC (clasa a II-a pentru TH, clasa I pentru CTL) și un peptid antigenic de pe suprafața unei celule prezentatoare de antigen (așa-numitele APC); peptidul rezultă din proteoliza antigenului în interiorul APC. Unele clone de LT au receptori TCR care recunosc lipide în combinație cu MHC [4].

Trebuie subliniat că recunoașterea unui antigen duce la inițierea unui răspuns imun contra antigenului numai în anumite condiții legate de stadiul de dezvoltare al LB sau LT, interacții cu alte tipuri celulare (în special TH), prezența anumitor citokine. Recunoașterea antigenului poate duce și la *deleția* sau *anergizarea* clonei LB sau LT. Deleția înseamnă moartea (apoptoza) celulelor clonei, anergizarea – blocarea temporară sau permanentă a răspunsului imun al clonei. Ambele feno-mene duc la *tolerarea* antigenului de către sistemul imunitar. În stadii timpurii, la LB în etape ale vieții fetale, la LT în etapa de maturare în timus, recunoașterea duce la toleranță față de antigenul respectiv. În acest sens [20], se pare că limfocitele (în special limfocitele T) care recunosc un antigen sunt activate numai dacă antigenul este prezentat de anumite celule dendritice speciale (APC). Dacă antigenul este prezentat de alte celule, limfocitele care îl recunosc suferă apoptoză. Aceste APC înglobează, accidental, antigene și self și nonself dar, fiind atrase în zone cu reacții inflamatorii, crește probabilitatea de încorporare a antigenelor nonself. Antigenele self sunt prezentate majoritar de alte tipuri celulare, ceea ce contribuie la moartea clonelor limfocitare care le recunosc, la așa-numita toleranță periferică.

Antigenele și recunoașterea lor

Efect antigenic au în general macromoleculele (M> 10 000 Da), dar porțiunile care interacționează cu BCR sau TCR, așa-numiții *determinanți antigenici* sau *epitopi,* sunt mult mai mici. Date bazate pe cristalografie de raze X pentru complexe BCR–epitop indică aproximativ 15 resturi aminoacidice (aria suprafeței de contact

Scanned with OKEN Scanner

750 Å^2) pentru anticorpi HyHEL–5 cu lizozim [5], dar numai trei resturi zaharidice (echivalent ca greutate moleculară cu cinci resturi aminoacidice) pentru un complex anticorp–Fab cu un dodecazaharid de *Salmonella* [6]. Pentru TCR de TH molecula MHC–II fixează în şanţul acesteia un peptid de 13–17 resturi aminoacidice, pentru TCR de CTL molecula MHC–I fixează un peptid de 8–10 resturi aminoacidice dar se pare că numai 4–5 resturi aminoacidice ale peptidului antigenic interacţionează cu TCR (care mai interacţionează şi cu porţiuni ale moleculei MHC clasa I sau clasa II-a).

Molecule mici de 2,4 – dinitrofenol nu duc la elicitarea de anticorpi solubili decât dacă sunt cuplaţi (chimic) cu o proteină – de exemplu albumina serică bovină (BSA). Aceste molecule mici se numesc haptene iar anticorpul elicitat în urma legării complexului haptenă – BSA recunoaşte haptena, o fixează cu mare afinitate (Kd mică).

Se vorbeşte despre antigene tari şi antigene slabe. În cazul antigenelor solubile, primele sunt recunoscute în concentraţii mici, de regulă pornind de la 10^{-12} M, celelalte la concentraţii mari, limita superioară cam 10^{-5}M. În ceea ce priveşte antigenele superficiale de pe suprafaţa unor membrane bacteriene sau celulare, există mult mai puţine date dar concentraţia superficială (epitop/nm^2 sau Å^2) ar trebui să joace rolul concentraţiei volumice. Membranele celulare au o consistenţă semilichid–semisolid, ceva în genul aşa-numitelor cristale lichide şi permit difuzia bidimensională relativ uşoară a macromoleculelor legate de suprafaţa exterioară şi chiar şi a celor ce străbat faţa interioară a membranei. Cam în acelaşi sens se vorbeşte de *determinanţi antigenici majori* şi *minori*. Este vorba de determinanţi, în general superficiali, primii recunoscuţi relativ uşor, ceilalţi greu. În cazul antigenelor solubile concentraţia minimă pentru recunoaştere corespunde constantei de disociere Kd a complexului antigen–BCR sau TCR. Recunoaşterea antigen–anticorp depinde, în afară de concentraţia sau densitatea superficială a antigenului (şi probabil şi a BCR sau TCR), de condiţii precum temperatura T şi compoziţia mediului în care se lucrează, tăria ionică şi, dacă se studiază interacţia nu per celulă (LT şi LB) ci per ţesut, eventual şi de adaosul unor adjuvanţi. Recunoaşterea antigenului de către BCR sau TCR duce, *via* modificarea părţii intracelulare a receptorului, la emiterea unor mesageri secundari spre interiorul celulei LB sau LT, cu inducerea unor procese de diferenţiere spre stadii mai mature, proliferare şi, în final, iniţierea apărării imunitare contra antigenului. Aceasta, evident dacă se primesc şi semnalele costimulatoare corespunzătoare provenite din procese mai puţin specifice decât recunoaşterea antigenului, şi anume interacţia citokinelor cu receptorii lor sau alte interacţii ligand-receptor între celulele TH şi APC.

Există teoria că natura răspunsului la recunoaşterea antigenului (pornirea apărării imunitare sau deleţie sau anergizare) depinde de concentraţia antigenului sau, implicit, de densitatea superficială sau de tăria acestuia. Declanşarea

Scanned with OKEN Scanner

răspunsului imun s-ar face între anumite limite de concentrație – la concentrații prea mari sau prea mici ar avea loc o anergizare [7]. Nu este clar dacă o asemenea comportare este generală sau valabilă numai pentru anumite antigene și clone. Prin concentrație mică se înțelege adesea un antigen slab care leagă cu afinitate relativ mică (Kd mare) la BCR sau TCR.

Există ideea că acești așa-ziși antigeni slabi acționează ca agoniști parțiali (sau antagoniști); ei se leagă de receptor dar parțial defectuos, receptorul nu transmite celulei decât o parte din semnale, rezultând nu inițierea apărării ci anergizarea. Este ceea ce se întâmplă cu o clonă de celule T (la șoarece) implicate în encefalomielită (proces autoimun), care este anergizată prin interacția cu un derivat de substituție aminoacidică (^{96}Phe – Ala) al peptidului encefalomielitogen, APL p87 – 99 [8] (care activează clona spre procesul autoimun).

În ceea ce privește anergizarea la concentrații mari, conform unor idei mai vechi [9], cum BCR este bivalent (fiecare BCR cu două situsuri de legare a antigenului) iar antigenii în general polivalenți, activarea LB implică formarea unei rețele de BCR–antigen, cu concentrarea BCR la un pol al celulei. La concentrații mari de antigen, fiecare antigen leagă un singur BCR și nu are loc reticularea, apărând în schimb anergizarea, toleranța față de antigenul respectiv.

Antigene timo-dependente și timo-independente

Pentru a activa o clonă LB să producă anticorpi, majoritatea antigenelor (așa-numitele antigene timo-dependente) trebuie recunoscute și de către o clonă T helper (TH). Clonele LT suferă un proces de maturare în timus și în absența funcționării timusului aceste antigene nu pot fi recunoscute. Antigenele timo-independente nu necesită cooperarea cu celulele TH pentru a activa o clonă LB. Este vorba de antigene cu unități repetitive, cum ar fi unele polizaharide din capsula pneumococului. Acestea prezintă minimum 12 determinanți antigenici per antigen și, datorită flexibilității polizaharidului, pot lega concomitent un număr mare de BCR de pe suprafața LB.

În cazul antigenelor timo-dependente acestea sunt fagocitate de celule cu capacitatea de APC care exprimă molecule MHC clasa a II-a. Antigenul, de regulă o proteină, suferă o proteoliză intracelulară iar unele dintre peptidele rezultate sunt prezentate la suprafața APC ca și complexe peptid-MHC-II. Aceste complexe sunt recunoscute de celulele unei clone TH care devin activate și secretă anumite citokine (interleukine).

APC pentru TH sunt macrofagele și limfocitele B. Când un LB recunoaște un antigen el devine „preactivat", internalizează o parte din antigenul fixat pe BCR și prezintă, în urma prelucrării, complexe peptid (din antigen)–MHC–II pe suprafața sa. Dacă o celulă TH recunoaște prin TCR-ul său aceste complexe, prin secreție de

Scanned with OKEN Scanner

citokine şi prin contact direct cu anumiţi receptori ai LB „preactivat", se produce activarea LB care suferă un proces de proliferare şi diferenţiere cu formarea finală a unui număr mare de plasmocite care secretă anticorpul solubil (cu aceeaşi specificitate ca şi BCR al LB). Evident, pentru o activare specifică a clonei LB care a recunoscut antigenul identificat (sub forma de complex peptid –MHC–II) şi de către clona TH, este necesar un contact direct între celula B şi celula TH (sau cel puţin o apropiere spaţială preferenţială, de exemplu în foliculii limfoizi). Nu există decât un număr limitat de interleukine faţă de numărul enorm de antigene!

Celulele citotoxice recunosc complexe peptid (antigenic)–MHC–I pe suprafaţa unor APC şi ucid celulele recunoscute prin secreţia de perforine de către CTL, care găuresc membrana celulară. Practic orice celulă poate fi APC pentru CTL, întrucât orice celulă deţine molecule MHC–I. În urma proteolizei intracelulare se formează peptide, printre care şi peptide cu caracter antigenic din proteine implicate în procese canceroase sau proteine ale unor virusuri care au infectat celula. Aceste peptide formează complexe cu molecule MHC–I care sunt transportate la suprafaţa celulei şi recunoscute de celulele unei clone CTL. Se consideră că CTL este numai „preactivat" în urma acestei recunoaşteri şi este necesară interacţia cu o celulă TH (care a recunoscut şi ea antigenul „intern" al APC) pentru activarea propriu-zisă a CTL şi pentru procesul citolitic. Este mai puţin clar cum are loc recunoaşterea antigenului canceros sau viral de către TH şi cum are loc contactul TH–CTL necesar unei activări specifice.

Superantigenele sunt anumite exotoxine bacteriene, precum cele responsabile de tulburările generale din cursul toxiinfecţiilor alimentare, sau proteine virale, cum ar fi o proteină codificată de virusul rabic. Ele au o afinitate foarte mare pentru TCR sau BCR ($Kd=10^{-13} - 10^{-16}M$) dar nu recunosc situsul de legare al determinantului antigenic ci se fixează în apropiere, pe secvenţe constante şi comune unui mare număr de TCR sau, respectiv, BCR. Este produsă astfel o activare policlonală, în general aberantă, a clonelor LT sau LB cu anergizarea ulterioară a acestor clone şi efecte detrimentale asupra apărării imunitare.

Anticorpii. Receptorii BCR şi TCR

Anticorpii solubili, TCR şi BCR, fac parte din superfamilia imunoglobulinelor şi prezintă o serie de similarităţi (vezi figura 1 şi figura 2). Este vorba în general de proteine cu patru lanţuri peptidice, în cazul anticorpilor solubili şi BCR (două lanţuri grele H şi două lanţuri uşoare L) sau de două lanţuri peptidice pentru TCR (lanţ α şi lanţ β), lanţuri menţinute împreună, în primul rând, prin legături disulfidice. Aceste lanţuri conţin regiuni constante (C), practic cu aceeaşi secvenţă aminoacidică pentru toţi anticorpii solubili dintr-o anumită clasă (IgG, IgM etc.) sau pentru toţi BCR, respectiv toţi TCR, precum şi regiuni variabile V, care diferă de la un BCR

Scanned with OKEN Scanner

(anticorp solubil) la altul şi de la un TCR la altul. BCR şi anticorpii solubili au câte două situsuri de legare pentru determinantul antigenic, TCR un situs (pentru complexul peptid-MHC), situsuri de legare la care participă substanţial regiunile variabile. Aceasta explică diversitatea enormă a BCR şi TCR, necesară pentru recunoaşterea numărului enorm de determinanţi antigenici de la patogenii cu care organismul vine în contact. În afara acestor situsuri de legare a antigenelor, pe moleculele BCR şi TCR există receptori pentru semnalizarea intracelulară, iar pe moleculele anticorpilor solubili receptori pentru legarea complementului; aceşti receptori, evident, aparţin regiunilor constante.

Problema este că în genomul mamiferelor poate exista un număr limitat de gene pentru codificarea regiunilor variabile ale BCR şi TCR, faţă de diversitatea enormă a receptorilor necesari pentru apărarea imunitară. La şoarece există 250 fragmente genice Vk pe cromozomul 6 şi cinci gene Jk. Diversificarea se obţine printr-un proces special de recombinare a fragmentelor V(D)J prin acţiunea aşa-numitei V(D)J recombinaze, care recunoaşte anumite secvenţe ale acestor fragmente genice şi produce recombinarea la întâmplare a acestor fragmente pentru formarea unor gene noi pentru lanţurile L şi H. Se pot forma astfel câte 5x250, aproximativ 10^3 tipuri de gene pentru catena L şi H. Printr-un mecanism de excludere alelică a reglajului celular, în fiecare celulă LB sau LT într-un stadiu timpuriu de dezvoltare al acestora rămâne funcţională şi transcrisă o singură genă

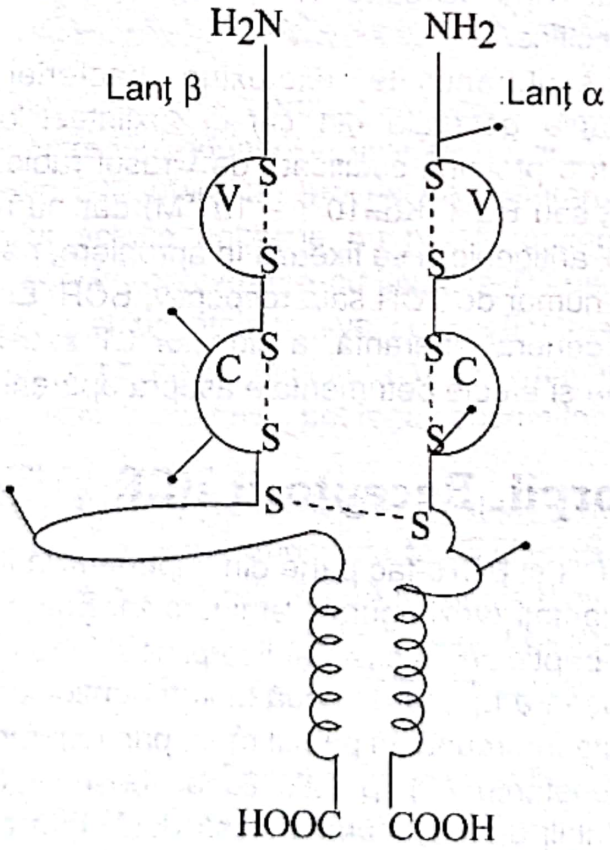


Figura 1

Scanned with OKEN Scanner

pentru lanţul uşor şi una singură pentru lanţul greu. Rezultă astfel în total circa $10^3 x 10^3$, aproximativ 10^6 combinaţii posibile VH:L şi tot atâtea posibilităţi de diversitate pentru BCR şi TCR. În afară de aceasta, în cursul recombinării V(D)J au loc deplasări ale cadrului de citire (frameshift) al secvenţelor nucleotidice V(D)J recombinate, fiecare deplasare generând o secvenţă genică (L sau H) diferită. În afară de acest proces de recombinare care are loc în stadii timpurii, în LB activate, în cursul procesului de evoluţie spre plasmocit are loc un proces de diversificare prin mutaţii somatice speciale în genele pentru lanţul L, respectiv H. În acest proces, mutantele cu BCR cu afinitate crescută pentru antigen suferă o accelerare a vitezei de proliferare. Are loc o selecţie pozitivă a celulelor B (pre-plasmocit). Într-o fază prenatală sau postnatală timpurile, în cursul procesului de recombinare are loc o selecţie negativă, prin deleţie, a LB cu BCR care recunosc determinanţi antigenici self.

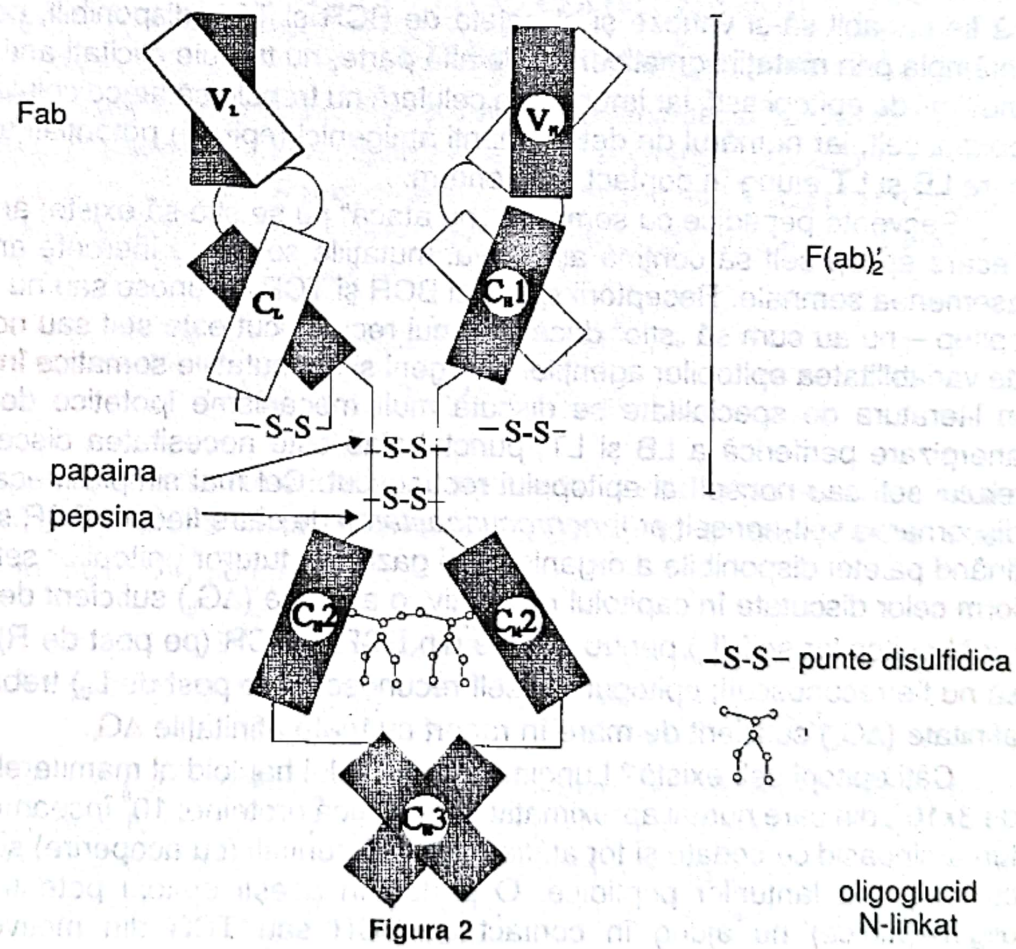


Figura 2

Receptorul de antigen al limfocitului B: V – regiune variabilă; C – regiune constantă; S – S legătură disulfidică; ● grupare glucidică; COOH – capăt carboxi terminal; NH_2 – capăt amino terminal.

Scanned with OKEN Scanner

În ceea ce privește celulele T, procesul de maturare are loc în timus. În cursul procesului de maturare are loc întâi o selecție pozitivă prin care supraviețuiesc numai LT cu TCR cu o afinitate suficient de mare pentru una din moleculele MHC-I sau II (funcție de tipul de celulă T). Urmează un proces de selecție negativă – sunt deletate LT cu TCR cu o afinitate prea ridicată față de complexele peptid (derivat din proteine self) –MHC prezentate în timus.

Problema specificității în apărarea imunitară [10]

Apărarea imunitară trebuie să distrugă agenții patogeni pătrunși în organism și celulele pornite pe calea malignizării, adică cel puțin un determinant antigenic al fiecărui agent patogen trebuie recunoscut de o clonă LB și/sau LT, deci de către un tip de BCR și/sau TCR. Agenții patogeni, prin înalta lor variabilitate (în special la virusuri) pot să-și modifice epitopul (epitopii) recunoscut; sistemul imunitar trebuie să fie capabil să-și varieze și el paleta de BCR și TCR disponibili, ceea ce se și întâmplă prin mutații somatice. Pe de altă parte, nu trebuie elicitați anticorpii contra mulțimii de epitopi self, iar imunitatea celulară nu trebuie să atace celulele ce poartă epitopi self, iar numărul de determinanți antigenici (epitopi) potențiali ai self-ului cu care LB și LT ajung în contact este enorm.

Secvențe peptidice cu semnalul „nu atacă" nu se știe să existe; ar fi și greu ca fiecare epitop self să conțină așa ceva, mutațiile somatice inerente ar și deteriora asemenea semnale. Receptorii specifici BCR și TCR recunosc sau nu recunosc un epitop – nu au cum să „știe" dacă epitopul recunoscut este self sau nonself. Legat de variabilitatea epitopilor agenților patogeni și de mutațiile somatice în LB activate, în literatura de specialitate se discută mult mecanisme ipotetice de deleție sau anergizare periferică a LB și LT; punctul slab este necesitatea discernării caracterului self sau nonself al epitopului recunoscut. Cel mai simplu mecanism pentru discernarea self-nonself ar fi *nonrecunoașterea* de către fiecare BCR și TCR (aparținând paletei disponibile a organismului gazdă) a tuturor epitopilor self adică, conform celor discutate în capitolul respectiv, o afinitate (ΔG_{ij}) suficient de mică a tuturor N epitopilor self (L_j) pentru fiecare din BCR și TCR (pe post de R), astfel încât să nu fie recunoscuți; epitopul nonself recunoscut (pe post de L_0) trebuie să aibă o afinitate (ΔG_0) suficient de mare în raport cu toate afinitățile ΔG_i.

Câți epitopi self există? Lungimea genomului haploid al mamiferelor este în jur de $3x10^9$, din care numai aproximativ 3% codifică proteine; 10^8 înseamnă $3x10^7$ resturi aminoacidice codate și tot atâția epitopi potențiali (cu acoperire) scurți în raport cu lungimea lanțurilor peptidice. O parte din acești epitopi potențiali (secvențe oligopeptidice) nu ajung în contact cu BCR sau TCR din motive structurale (secvențe în interiorul globulei proteice), alte secvențe sunt comune multor proteine. Pe de altă parte, și polizaharidele, posibil și lipidele, participă la paleta de epitopi self. Astfel, un număr $N=10^7$ de epitopi self care nu trebuie să fie recunoscuți pare o evaluare rezonabilă.

Scanned with OKEN Scanner

Cât de mare trebuie să fie situsul de combinare al receptorului de antigen (anticorpi solubili, BCR, TCR) pentru a putea discerne un epitop nonself din cei $N=10^7$ epitopi self? Cu 6% proteine în ser, cu o masă moleculară medie de 40 000, concentraţia totală a acestora ar fi în jur de $1{,}5\times10^{-3}$M. Pentru secvenţe oligopeptidice self de largă răspândire putem evalua, în medie, o secvenţă per moleculă proteică şi conform considerentelor dintr-un capitol precedent (secţiunea „Sisteme cu grad înalt de specificitate") avem pentru concentraţia maximă de „partener fals" (L_j) al situsului de combinare anticorpic (R), $c_{max}=c_j=1{,}5\times10^{-3}$M. Pentru a calcula diferenţa de afinitate ($\Delta G_0-\Delta G_j$) dintre nonself (corect) şi self (fals) din formula (15) mai avem nevoie de concentraţia c_0 a epitopului nonself recunoscut. Pentru antigenii „slabi", respectiv „tari", c_0 variază între 10^{-5}M şi 10^{-12}M. Se obţine astfel (2,3RT≅1,4 kcal/mol la 37°C).

$$\Delta G_0-\Delta G_j>2{,}3RT\lg\frac{c_j}{c_0}=\begin{cases}\cong 3\ \text{kcal/mol (antigen slab)}\\ \cong 13\ \text{kcal/mol (antigen tare)}\end{cases} \qquad (1)$$

Studiile privind afinitatea derivaţilor de substituţie aminoacidică a unei haptene pentru anticorpul elicitat de haptenă (cuplată cu o proteină) indică o scădere a afinităţii cu, în medie, $\Delta\bar{g}$ = 2,0 kcal/mol, per substituţie aminoacidică [11]. Utilizând formula (13), numărul de substituţii (în epitopii self, falşi, de concentraţie maximă) la limita de antigen „slab" şi „tare" va fi:

$$\upsilon\geq\frac{\Delta G_0-\Delta G_j}{\Delta\bar{g}}=\begin{cases}\cong 2\ \text{(antigen slab)}\\ \cong 7\ \text{(antigen tare)}\end{cases} \qquad (2)$$

Putem calcula o limită superioară, de siguranţă, pentru mărimea n a situsului de combinare, considerând limita superioară c_{max} pentru concentraţia tuturor epitopilor self. Cu formula (14) obţinem:

$$n>\upsilon-1+\frac{\lg 10^7+(\upsilon-1)\lg\frac{n}{\upsilon-1}}{\lg 20}=\begin{cases}\cong 7\ \text{(antigen slab)}\\ \cong 12\ \text{(antigen tare)}\end{cases} \qquad (3)$$

Evident, aceste considerente, şi aşa aproximative, se referă la recunoaşterea antigenelor solubile. Nu este uşor să le extindem la determinanţi antigenici de pe suprafaţa bacteriilor şi a celulelor. Putem evalua însă o limită inferioară (necesară, probabil nu suficientă) pentru a duce la nonrecunoaşterea (pentru epitopul self). Aplicând formula (7), tot din capitolul 7, obţinem:

$$n>\frac{\lg 10^7}{\lg 20}\cong 6 \qquad (4)$$

Scanned with OKEN Scanner

În ceea ce privește determinările prin cristalografie de raze X a mărimii situsului de combinare (vezi al doilea paragraf), mărimea de n≅15 resturi aminoacidice pentru anticorpi tipici contra antigenelor proteice este sigur suficientă pentru o discernare self-nonself în condițiile discutate.

Pentru mărimea indicată a situsului Fab anti-dodecazaharid de *Salmonella*, n=3 resturi zaharidice, discuția este dificilă în lipsa unei evaluări a numărului N de epitopi oligozaharidici self.

Pentru TCR, se pare că numai 4–5 catene laterale aminoacidice ale peptidului antigenic interacționează cu situsul de combinare, puțin chiar și pentru limita inferioară (4). Probabil că aici acționează un „reglaj în cascadă". Pe de-o parte, la generarea peptidelor potențial antigenice, proteazele clivează proteinele (self și nonself) preferențial, între anumite resturi aminoacidice, ceea ce va face ca numărul N de peptide rezultate din proteine self să fie mult sub evaluarea $N=10^7$. Pe de altă parte, moleculele MHC au, probabil, afinități preferențiale pentru anumite peptide (derivate din proteine) nonself, care vor predomina în complexele cu MHC prezentate la suprafața celulei, comparativ cu raportul concentrațiilor intracelulare ale peptidelor nonself și self. În ceea ce privește paleta disponibilă de molecule MHC clasa I și respectiv a II-a, codificate la om de regiunile genice HLA–I și -II, pe celulă există 3–6 tipuri diferite de molecule MHC clasa I și cam 10^5 molecule per tip și celulă. Se pare că fiecare tip MHC clasa I poate lega peptide numai din circa 1% din proteinele codificate de genomul uman, ceea ce ar vorbi pentru o afinitate relativ mică pentru self. Stimularea unui limfocit T necesită în jur de 200 complexe peptid–MHC identice pe suprafața APC[15].

Considerente de echilibru chimic. Teoria lui Burnet privind discriminarea self-nonself [12, 16]

Interacția antigen (AG_i –mai exact epitop)–anticorp (AC_j–solubil, BCR sau TCR) va asculta de legile echilibrului chimic. Saturarea situsurilor de pe anticorp, BCR sau TCR, va asculta de o lege tip:

$$nAG_i + AC_j \leftrightarrow \text{Complex}; \quad \Theta_j = \frac{[AG_i]^n}{[AG_i]^n + K_{ij}^n} \qquad (5)$$

unde Θ_j este gradul de saturare al acestor situsuri iar K_{ij} corespunde unei constante de disociere a AG_i de pe situsurile AC_j. Aici n≥1 reflectă, cel puțin aproximativ, gradul de cooperativitate (n>1) al interacției. Pentru un grad marcat de cooperativitate, variația lui Θ_j cu concentrația $[AG_i]$ va lua un caracter „totul sau

Scanned with OKEN Scanner

nimic" (Θ =1 sau 0), formarea complexului având un caracter de reacţie de precipitare, după cum produsul de solubilitate corespunzător, P_{ij}, este sau nu depăşit:

$$[AG_i]\times[AC_j]\geq P_{ij}\begin{cases}\text{Da: } \Theta=1\\ \text{Nu: } \Theta=0\end{cases} \qquad (6)$$

Aceste considerente se pot referi atât la recunoaşterea antigenului, cât şi la interacţii antigen solubil-anticorp, cu formare de precipitate (urmate de legarea complementului, fagocitoză). Sunt considerente cu caracter mai degrabă semicantitativ, iar în cazul unor epitopi sau anticorpi superficiali, $[AG_i]$ şi $[AC_j]$ vor avea semnificaţia unor densităţi superficiale.

K_{ij} şi P_{ij} sunt cu atât mai mici, cu cât afinitatea epitop(i)-situs de combinare anticorp(j) este mai mare, cu cât concentraţia sau densitatea superficială prag (la care AG_i este recunoscut de AC_j) este mai scăzută:

$$[AG_i]_{prag}\cong K_{ij};\quad K_{ij}=e^{-\Delta G_{ij}/RT}, P_{ij}=e^{-\Delta G_{ij}/RT} \qquad (7)$$

Pentru evitarea declanşării unei reacţii autoimune este astfel suficient ca toate concentraţiile sau densităţile superficiale ale celor N epitopi self (AG_i) să fie sub pragurile necesare pentru recunoaşterea de către toţi situşii BCR şi TCR (AC_j) disponibili ai sistemului imunitar. Concentraţiile de anticorpi solubili trebuie să rămână de asemenea, chiar şi în urma elicitării de către un agent patogen, sub pragul la care s-ar produce o „precipitare" pe oricare din AG_i self (urmată de distrugerea AG_i).

În ceea ce priveşte distrugerea agenţilor patogeni (şi a celulelor infectate sau maligne), agentul patogen trebuie să prezinte cel puţin un epitop (AG_i) la o concentraţie (densitate superficială) supraprag, necesară recunoaşterii de către BCR sau TCR (AC_j) cu cea mai mare afinitate (ΔG_{ij}) pentru AG_i, dintre receptorii anticorpici disponibili în organismul gazdă.

Aceste considerente corespund foarte bine cu teoria lui Burnet a selecţiei clonale. Genomul, prin selecţie naturală, va conţine exoni (pentru AC_j) pentru recunoaşterea unor epitopi de pe principalii agenţi patogeni. Procesele de diversificare prin recombinări (etc.) în faza embrionară sau ulterior vor duce la formarea unei palete diverse de BCR şi TCR, dintre care receptorii care recunosc un epitop self (AG_i) sunt eliminaţi prin deleţie clonală. Necesitatea interacţiei LB–LT helper, pentru iniţierea atacului împotriva celor mai multe antigene, ar avea sensul unui control suplimentar pentru evitarea unei reacţii autoimune. Astfel, chiar dacă un epitop al unui antigen self este recunoscut de BCR al unei clone LB, pornirea secreţiei masive de anticorpi necesită prezentarea de către LB a unor complexe

Scanned with OKEN Scanner

MHC-peptid (rezultate din atigenul self) unei clone LT helper care să recunoască complexul cu peptidul self. Ambele recunoașteri sunt puțin probabile, cu probabilități mici; activarea LB cu secreția de anticorpi contra epitopului self necesită ambele evenimente – probabilitatea sa fiind egală cu produsul celor două probabilități, deci foarte mică. Nu rezultă însă, de aici, vreun mecanism pentru deleția sau anergizarea periferică a clonelor LB și LT autoimune.

Considerentele de echilibru chimic permit o interpretare unică a antigenelor „slabe" și „tari", ale epitopilor „majori" și „minori". Un antigen „slab" va prezenta numai epitopi cu afinitate relativ redusă chiar și pentru repertoriul anticorpic cu cea mai mare afinitate (pentru epitopul cel mai „favorabil"); în consecință, concentrația (densitatea superficială) prag pentru recunoașterea antigenului slab va fi relativ mare. Antigenele „tari" vor prezenta cel puțin un epitop pentru care există un situs anticorpic (în sistemul imunitar al gazdei) cu afinitate mare – concentrația prag pentru recunoaștere este scăzută.

Recunoașterea unui număr „astronomic" de epitopi nonself nu va necesita existența unui număr egal de clone LB și LT. Un același BCR (sau TCR) poate recunoaște mai mulți epitopi cu structuri similare (fenomenul de „molecular mimicry"), evident, la concentrații prag diferite.

Bolile autoimune apar adesea în urma unor procese infecțioase intense și de durată. În cazul unor infecții severe și persistente apar concentrații mari de anticorpi care ar putea eventual depăși pragul pentru atacarea unor antigene self cu afinitate prea mică pentru BCR și TCR existenți în repertoriul imun, pentru a declanșa, ele însele, o recunoaștere de către o clonă LB. Procesul infecțios ar putea disponibiliza și epitopi self absenți de pe suprafața celulelor sau într-o densitate superficială sub prag în condiții fiziologice, care acum sunt recunoscuți de către un BCR sau TCR.

Determinarea concentrațiilor și a densităților superficiale ale diferiților epitopi sau receptori anticorpici este destul de laborioasă. De exemplu, în șoareci transgenici cu o genă de lizozim de găină, de regulă apare toleranța față de lizozim (în etape timpurii de dezvoltare). La șoarecii cu niveluri serice de lizozim foarte joase, sub 10^{-10}M, rămân clone LB care recunosc lizozimul injectat în concentrații mai mari la organismul adult [13]. De asemenea, în șoareci transgenici VSV-G(IND) celulele B nu recunosc glicoproteina virusului inclus în genom, prezentat ca autoantigen slab organizat, dar recunosc aceeași proteină aflată sub forma înalt repetitivă pe suprafața celulelor infectate [14].

Rețele idiotipice și alte mecanisme de reglaj

Jerne [17] a formulat o teorie de reglaj molecular a sistemului imun, bazată pe o interacție (ipotetică) a receptorilor BCR și TCR cu anticorpi anti-idiotip, dirijați împotriva situsurilor de combinare (a epitopilor) din BCR și TCR. Anticorpii secretați

Scanned with OKEN Scanner

de clonă și, respectiv, anticorpul antiidiotipic se au unul față de celălalt ca antigen și anticorpul secretat contra sa. Și contra situsului de combinare al receptorului clonei ce secretă anticorpul anti-idiotipic se poate elicita un al treilea anticorp – cu situsul de combinare similar cu al primului anticorp (nu neapărat identic – în elicitarea anticorpului anti-idiotipic poate să nu fie implicat tot situsul de combinare și pot interveni și alte zone ale moleculei anticorp pe post de epitop). Se formează astfel o rețea de clone care „se țin în frâu" reciproc prin anticorpi anti-idiotipici. Asemenea rețele ar trebui să regleze secreția de anticorpi la apariția unui antigen străin, să împiedice atacul contra epitopilor self – însă nu par să existe modele concrete pentru așa ceva.

S-au formulat modele matematice bazate pe interacții idiotip-anti-idiotip pentru memoria imunologică [18] – cele două clone se inhibă reciproc prin anticorpi și se mențin la nivel scăzut. Revenirea antigenului inițial blochează clona anti-idiotip și permite o proliferare rapidă a clonei ce elicită anticorpi contra antigenului (răspuns imun secundar).

S-au pus în evidență anticorpi anti-anticorpi dar nu contra situsului de combinare antigenic ci contra unei zone constante, comune tuturor anticorpilor solubili [19]. Acești anticorpi apar în cursul unor elicitări masive de anticorpi (infecții puternice) și au rol în frânarea acestor elicitări. Zonele constante având o concentrație superioară situsurilor de combinare BCR, care diferă de la o clonă la alta, este mai probabil să se genereze anticorpi contra unei zone constante decât a unui situs de combinare, dacă paleta de BCR-uri din sistemul imun nu este „programată special" pentru interacții anti-idiotip.

Pentru memoria imunologică, teorii recente implică, în afară de celulele speciale de memorie, interacții intercelulare în cadrul foliculilor limfoizi – un fel de nișă la nivelul organelor limfoide secundare, formate din complexe de celule. În acești foliculi s-ar acumula antigenele străine, probabil *via* anticorpii care îi leagă și care se fixează de celulele foliculare dendritice (FDC) prin intermediul receptorilor Fc, și care au o persistență îndelungată la acest nivel. Ar avea loc o selecție a unor clone LB care au o specificitate dublă (bazată pe mimarea moleculară a antigenelor) pentru antigenul unui patogen rar și pentru un antigen relativ frecvent, exprimat practic continuu de către FDC [20].

FDC ar fi implicate și în fenomenul toleranței periferice. Celulele LB care au BCR cu afinitate pentru antigenele fixate de FDC intră într-o anumită zonă a foliculului și proliferează în timp ce cele fără afinitate sau cu afinitate scăzută rămân într-o zonă exterioară a foliculului și sunt deletate. Rămâne de explicat cum la nivelul foliculului se fixează doar antigenele nonself, nu și cele self.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Referinţe generale: a) Păunescu V., Tatu C. A., Stănescu D. I. şi Medrea D. P. (1996) *Imunologie: concepte fundamentale şi aplicative,* Helicon, Timişoara; b) Zarnea Gh. (1990) *Tratat de microbiologie generală,* vol. IV, Editura Academiei Române, Bucureşti; c) Moraru I. (1984) *Imunologie,* Editura Medicală, Bucureşti.

2. Riddihough G. (1994) First line defense. *Nature,* **372** (6501), 114.

3. Gumperz J. E., Parham P. (1995) The enigma of natural killer cells. *Nature.* **378** (6554), 245.

4. Parham P. (1994) Antigen presentation. Chewing the fat. *Nature,* **372** (6506), 615.

5. Amit A. G. (1986) Three dimensional structure of an antigen–antibody complex at 2.8 – resolution. *Science,* **233,** 747.

6. Cygler M. (1991) Recognition of a cell surfance oligosaccharide of pathogenic *Salmonella* by an antibody Fab fragment. *Science,* **253,** 442.

7. Evavold B. D. (1993) Tickling the TCR: selective cell function stimulated by altered peptide ligands. *Immunol. Today,* **14,** 602.

8. Kersh G. J., Allen P. M. (1996) Essential flexibility in the T–cell recognition of antigen, *Nature,* **380** (6574), 495.

9. Eisen H. N., Karush F. (1964) Immune tolerance and the role of extracellular regulation of bivalent antibodies. *Nature,* **202** (4933), 677.

10. Simon Z. (1973) *Biochimie cuantică şi interacţii specifice,* Editura Ştiinţifică, Bucureşti, paragraf 7.5.

11. vezi Simon Z., Ghetie V. (1971) *Rev. Roum. Biochimie,* **8,** 261 – analiza datelor din: Spragg J et al (1969) *Biochemistry,* 7, 4086; Schaechter J (1970) *Nature,* **228**, 639; Parker CW et al (1966) *Biochemistry,* **5**, 2314.

12. a) Simon Z. (1992) Chemical equilibrium considerations and self–nonself discrimination. Role of T helper cells. *Fiziologia–Physiology,* **2**(2), 11; Simon Z., Tatu C. (1994) Antigen and antibody concentrations in anergy and autoimmune phenomena: a hypothetical connection. *Fiziologia–Physiology,* **4**(3–4), 15.

13. Adelstein S. (1991) Induction of self tolerance in T–cells but not B–cells of transgenic mice expressing little self antigen. *Science,* **251**(4998), 1223.

14. Bachmann M. F. (1993) The influence of antigen organization on B–cell responsiveness. *Science,* **262** (5138), 1448.

15. Falk K. (1990) Allele specific motifs revealed by sequencing of self peptide eluted from MHC molecules. *Nature,* **351,** 290.

16. Burnet M. F. (1959) The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity, Cambridge University Press, London.

17. Jerne N. K. (1974) Towards a network theory of immune response. *Ann. Immunol.* (Paris), **125C,** 373.

18. Kepler T. A., Perelson A. S. (1993) Cyclic re–entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation. *Immunol. Today,* **14,** 412.

19. Terness P. (1992) Regulation of antibody response by an IgG–anti–Ig autoantibody occuring during alloimmunization. *Transplantation,* **54,** 92.

20. a). Matzinger P. (1994) Immunology, Memories are made of this? *Nature,* **369,** 605; b) Selim LK et al (1994) *J. Exp. Med.,* **179,** 1933.

Scanned with OKEN Scanner

BAZELE MOLECULARE ALE SISTEMULUI REGLATOR IMUNITAR

F. SCHNEIDER

Funcţionalitatea unitară a organismului este posibilă graţie unui sistem reglator-intergrator complex, neuro-endocrino-umoral. Primordialitatea revine sistemului nervos prin recepţia stimulilor şi acţiunea directă la nivelul sistemelor constitutive ale organismului, cât şi prin modificarea circulaţiei şi a constituenţilor mediului intern. Mediul intern, la rândul lui, pe lângă faptul că reprezintă mediul de viaţă al celulelor, are o compoziţie la care concură fiecare celulă în parte, şi suferă influenţe din partea tuturor celulelor [10]. În acest mod, şi sistemul nervos, influenţând funcţionalitatea diferitelor sisteme celulare, va suporta efectul propriei sale activităţi.

Un loc aparte revine în cadrul sistemelor celulare sistemului endocrin, dar sistemul imunitar este şi el caracteristic sistemelor evoluate [1].

Se conturează în felul acesta trei categorii de legături bidimensionale:

– sistem nervos – sistem endocrin [6];

– sistem nervos – sistem imunitar;

– sistem endocrin – sistem imunitar.

Sistemul imunitar cuprinde ansamblul componentelor implicate în recunoaşterea şi anihilarea nonselfului. Urmărind responsivitatea imunitară putem delimita trei niveluri de acţiune:

1. răspunsul individual celular [1];
2. răspunsul cooperant celular şi celulă – produse celulare [1, 16, 17];
3. răspunsul ansamblului organismic.

În acest mod, funcţia imunitară reprezintă mai mult decât lupta antimicrobiană/antivirală/antitumorală, integrându-se sistemului complex ce asigură menţinerea homeostaziei, a integrităţii corpului şi a adaptabilităţii organismului.

Responsivitatea celulelor sistemului imunitar faţă de substanţele biologic active elaborate de sistemul nervos şi sistemul endocrin este posibilă graţie numeroşilor

Scanned with OKEN Scanner

receptori membranari şi intracelulari de care dispun limfocitele, monocitele, macrofagele, granulocitele şi mastocitele [14, 15].

Totodată, un rol deosebit revine inervaţiei organelor sistemului imun, terminaţiile nervoase venind în contact direct cu limfocitele şi macrofagele din aceste organe [9]. De asemenea, celulele sistemului imunitar sunt capabile să sintetizeze şi să secrete citokine şi o serie de substanţe hormon-like (prolactina, TSH, peptide derivate din propiomelanocortina) ce acţionează asupra sistemului nervos şi endocrin. Pe baza acestor considerente, sistemul imun este considerat drept „creier plutitor" („floating brain") [3].

O serie de cercetări experimentale au evidenţiat interconexiunile neuro-endocrino-imunitare. Încă din 1945, Grigore Benetato şi Ion Baciu demonstrează experimental intervenţia reglatoare şi integratoare a centrilor hipotalamici în reacţiile imune nespecifice şi specifice [2, 4]. Activarea sistemului nervos autonom simpatic determină creşterea numărului de leucocite şi limfocite, proliferarea şi diferenţierea limficitelor T şi B, creşterea numărului de limfocite Tc/s (CD8+CD57+), activarea celulelor NK, lansarea anticorpilor primari şi secundari [12].

Influenţele inervaţiei organelor limfoide au fost elocvent dovedite de cercetările lui Felten pe şobolani Lewis cu artrită reumatoidă [9]. Inervaţia peptidergică a organelor limfocitare acţionează prin potenţarea fenomenelor inflamatorii şi a proliferării limfocitare. În schimb, denervarea peptidergică pentru substanţa P, prin capsaicină, diminuă fenomenele inflamatorii. Denervarea noradrenergică agravează boala.

Se ştie că citokinele, în contrast cu hormonii, sunt produse cu acţiune, în cea mai mare parte, locală. Astfel, IL–2 este prototipul citokinei autocrine, produse şi cu acţiune pe celulele T [14]. În schimb, IL–1 este sintetizată, pe lângă macrofage, şi de creier, intervenind în reglarea mecanismului somn-veghe, termoreglare, comportament alimentar şi sexual [13]. IL–1, alături de alte citokine proinflamatorii, stimulează axa hipotalamo – hipofizo – suprarenaliană [8]. Mecanismul ar fi, după Conn şi Karonth [5], următorul: citokinele acţionează asupra unor interneuroni colinergici din grupul parvocelular hipotalamic, care fac sinapsa cu neuroni nitricoxidergici care, la rândul lor, lansează NO ce difuzează în neuronii secretori de neurohormoni hipofizotropi de tip CRH. În final se induce lansarea de glucocorticoizi care se ştie că inhibă producţia de mediatori ai inflamaţiei.

Sinteza de IL–1 monocitară este stimulantă de CRH şi vasopresina IL–1 şi la rândul ei, va determina limfocitele B să sintetizeze β-endorfine cu rol în modularea răspunsului imun de stres. Producţia de β-endorfină limfocitară este indusă şi de stimularea β-adrenergică, determinând prin acţiune locală paracrină modularea reactivităţii imunitare [3,8].

Scanned with OKEN Scanner

Studiile clinice au furnizat, de asemenea, dovezi privind legăturile bidirecționale sistem imunitar-sistem endocrin-sistem nervos. Se cunosc o serie de boli endocrine care sunt de origine autoimună – spre exemplu, tireopatiile imune.

Graviditatea, bine cunoscută ca o stare hipercorticosteroidă indusă de CRH-ul placentar, modifică tabloul unor boli autoimune. Astfel, femeile cu poliartrită reumatoidă au o remisiune în timpul sarcinii dar și o pronunțată exacerbare postpartum (Blowers L. E. – citat de [13]).

Heinrichsen și colab. (citat de [13]) consideră că în lupus sunt perturbări în repartiția și densitatea receptorilor β-adrenergici limfocitari. Această afirmație se bazează pe observația că bolnavii suferind de această boală, supuși la stres, deși au o descărcare normală de catecolamine, prezintă o redistribuție neobișnuită, alterată, a subseturilor limfocitare. Baerwald și Krause [13] au descris în boli autoimune o densitate scăzută a β2-adrenoreceptorilor pe mononuclearele sanguine.

Klein și colab. [13] consemnează la bolnavii cu lupus eritematos sistemic un catabolism exagerat al glucocorticoizilor la nivel limfocitar și, în consecință, un nivel sanguin scăzut, ceea ce determină o sporire a mediatorilor inflamației. Se ridică astfel întrebarea dacă perturbarea catabolismului corticosteroizilor nu ar putea constitui un factor favorizant în apariția unor boli autoimune.

Tot la bolnavii cu lupus, pe lângă alterările imunitare specifice, s-au observat și suferințe neuropsihice, cum sunt lentoarea reactivă și deficiențe ale memoriei de scurtă durată.

Dantzer [7] consideră că citokinele proinflamatorii ar fi responsabile de „comportamentul de suferință" (sickness behaviour): oboseală, indispoziție, apatie, imposibilitatea de a se concentra, la care se pot adăuga hipersomnia, anorexia, indiferența și depresia.

Relația bilaterală dintre statusul și reactivitatea imunitară și starea psiho-afectivă este un domeniu deosebit de actual, amplu dezbătut în ultimul timp. Desigur că aceasta implică reglarea nervoasă și cea endocrină.

Se știe că starea psihică depinde de o constelație de factori endogeni și exogeni. Factorii endogeni țin de starea și capacitatea funcțională a sistemului nervos, tipul personalității, percepția individuală a evenimentelor, modalitatea de a reacționa, constelația endocrină etc. Factorii exogeni sunt reprezentați de stimuli socio-psihici, natura și durata lor, suportul social, semnificația afectivă a evenimentului etc. În funcție de acești factori sunt induse lansările de mediatori și de hormoni realizând o stare psiho-neuro-endocrină de tip pozitiv-stenic, sau negativ – astenic, cu influențe modulatoare asupra sistemului imunitar. Așa se explică de ce solicitările moderate, pozitive cresc, în general, reactivitatea imunitară, în tip ce cele epuizate, de tip negativ, deprimă apărarea imunitară. În același sens, psihooncogeneza, intuită pentru prima dată de Victor Săhleanu, este

Scanned with OKEN Scanner

confirmată de cercetările din ultima vreme. Putem deci pleda pentru existenţa unei reţele interconectate sistem nervos-sistem imun-sistem endocrin (vezi figura 1).

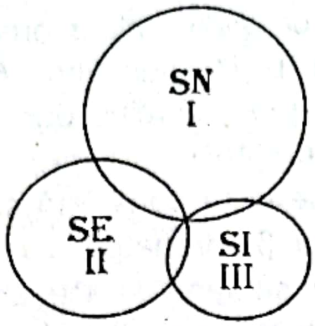


Figura 1

Comunicarea bidirecţională între sistemul nervos central şi sistemul imunitar se realizează pe două căi: sistemul nervos vegetativ şi sistemul neuroendocrin, la care se adaugă acţiunile modulatoare endocrino-imune, endocrino-nervoase şi psiho-neuro-imune (vezi figura 2). Acest concept se încadrează perfect în domeniul ADAPTOLOGIEI, o ştiinţă interdisciplinară, ce înglobează multiplele aspecte ale reacţiilor adaptative, inclusiv imunitare [11].

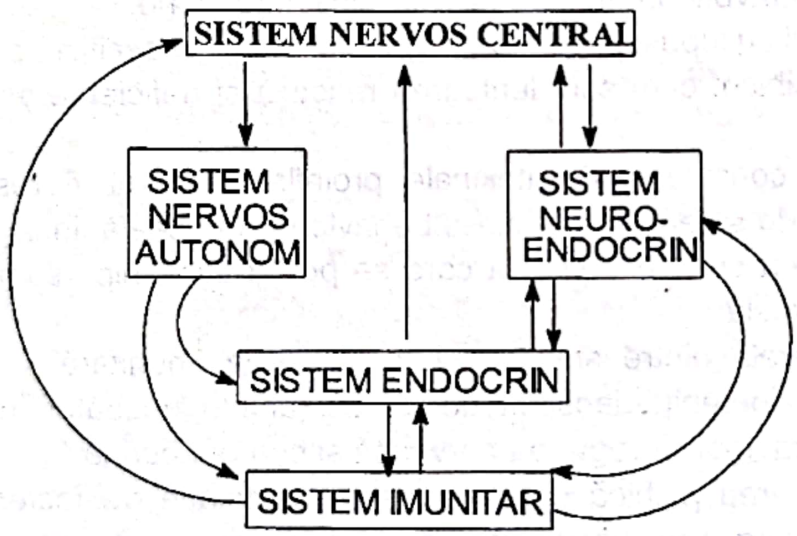


Figura 2

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Alberts B., Bray D., Levis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (1989) *The Molecular Biology of the Cell,* Garland Publ., New York.

2. Baciu I., Derevenco V., Vitebski W., Ilea V., Grosu M. (1967) *St. cerc. endocrin,* **18**:121.

3. Ballieux R. E. (1992) *Eur. J. Clin. Invest.*, **22, suppl. 1**:6.

4. Benetato G., Baciu I., Vlad L. (1945) *Schweizenische Med Wochenschrift,* **75**:702.

Scanned with OKEN Scanner

5. Conn S. M., Karonth S. (1994), *Neuroendocrinology*, **60, suppl.1**:18, S131.
6. Coculescu M. (1986) *Neuroendocrinologie clinică*, Ed. Ştiinţ. Enciclop., Bucureşti.
7. Dantzer R. (1994) *Neuroendocrinology*, **60, suppl.1**:18, S13.2.
8. Del Reg A., Basedowsky H. O. (1992) *Eur. J. Clin. Invest.*, **22, suppl.1**:10.
9. Felten D. L., Felten S. Y., Bellinger D. L. (1992) *Eur. J. Clin. Invest.*, **22, suppl.1**:37.
10. Hăulică I., Brănişteanu D., Petrescu G. (1983) *Hormonii locali*, Ed. Junimea, Iaşi.
11. Hăulică I. (1994) *Fiziologia–Physiology*, **4,1–2**:5.
12. Hinrichsen H., Fölsch U., Kirch W. (1992) *Eur. J. Clin. Invest.*, **22, suppl.1**:21.
13. Johnson E. O., Mentropoulus M. (1992) *Eur. J. Clin. Invest.*, **22, suppl.1**:2.
14. Kaplan D. (1996) *Immunol. Today*, **17**:303.
15. Păunescu V., Tatu C. A., Stănescu D. I et al (1996) *Imunologie, concepte fundamentale şi aplicative*, Ed. Helicon, Timişoara.
16. Raica M. (1995) Sistemul mastocitar, Ed. Mirton, Timişoara.
17. Winrow V. R., Winigard P. G., Morris C. J. et al (1993) *British Med. Bull.*, **49**:506.

Scanned with OKEN Scanner

CURRENT ASPECTS OF MOLECULAR BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

Z. SIMON and F. SCHNEIDER, EDITORS

Abstract

The last decades produced tremendous advances in molecular aspects of cell biology and immunology, cell signalling, cell growth and division. The concept of molecular physiology, based on that of molecular biology, is now well established.

This book aims to present current aspects in these fields for advanced students and young researchers in the field of medicine, biology, chemistry, biophysics. It gives only an introduction in these fields. For those interested to specialise in one of the fields described, textbooks, reviews are indicated. A much greater volume than the about 150 pages would have been necessary for an introduction in all the main fields of contemporary molecular biology and physiology. The two coordinators selected those fields, for which persons with a sufficient knowledge, or even with some research experience, were available in the Timişoara universitary centre.

The first chapters following the introductory one are devoted to biomacromolecules, the physicochemical basis of molecular biology – some thermodynamic, kinetic and especially structural aspects, intermolecular forces, their influence upon the tridimensional structure of biologic macromolecules, electrophoretic and mass spectrometric methods for primary protein structure and DNA techniques for nucleic acid structure. Receptor–ligand interactions are described from the point of view of molecular biology and a general theory for precision in biologic recognition processes is outlined, based on chemical equilibrium considerations. The next chapters are devoted to problems related to cytology. Chapter eight is devoted to gene activity regulation in eukariotes, chromosome and transcription complex (regulatory protein) structure. Chapter nine concerns the characteristics of cell cycle and growth regulation and molecular mechanisms implied. Chapter ten gives a brief description of mathematical modelling of cell regulation with a model for positive gene control (self regulated gene) as example. Chapter eleven describes some molecular aspects of apoptosis. Chapter twelve is

Scanned with OKEN Scanner

devoted to recent techniques based upon hybridisation of oligonucleotide chains, restriction enzymes, used in gene therapy.

The last two chapters are connected to immunology and the molecular basis of self-nonself discrimination and of the immunological regulation of human body.

We hope that this book, which is not a treatise, will be able to give a general view upon the molecular aspects of cell biology and physiology to the romanian reader which intends to enter the field of modern life sciences.

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Lista contributorilor 2

Cuvânt înainte; A. Ardelean 5

În loc de introducere; F. Schneider şi Z. Simon 7
De la chimie–fizică la celula vie; Z. Simon, F. L. Eleneş
şi E. P. Şeclăman 9
Structura biomacromoleculelor; L. Kurunczi şi Z. Simon 21
Metode moderne de determinare a structurii primare
a proteinelor. Electroforeză bidimensională şi spectrometrie
de masă; S. Popa 35
Identificarea şi caracterizarea macromoleculelor polinucleotidice.
Tehnici de DNA recombinat; O. Sârbu şi C. A. Ţaţu 45
Interacţia receptor-ligand din perspectiva biologiei moleculare;
C.A. Ţaţu şi T.I. Oprea 59
Specificitate în interacţia receptor-efector; Z. Simon 76
Reglajul genelor la eucariote; Z. Simon 86
Creştere şi diviziune celulară; Z. Simon 98
Modelare matematică; G. I. Mihalaş şi Z. Simon 107
Apoptoza. O abordare moleculară; C. A. Ţaţu 113
Aplicaţii ale biologiei moleculare: Terapia genică; C. A. Ţaţu
şi O. Sârbu 123
Discriminarea self-nonself în apărarea imunitară; Z. Simon
şi F. Schneider 133
Bazele moleculare ale sistemului reglator imunitar; F. Schneider 147

Rezumat în limba engleză 153

Scanned with OKEN Scanner

CURRENT ASPECTS OF MOLECULAR BIOLOGY AND PHISIOLOGY

EDITORS: PROF. Z. SIMON, PH. D.
AND PROF. F. SCHNEIDER, M. D., PH. D.

Contents

List of contributors 2

Foreword; A. Ardelean 5

Instead of introduction; F. Schneider and Z. Simon 7
From chemical physics to the living cell; Z. Simon, F. L. Eleneş and E. P. Şeclăman 9
Structure of biomacromolecules; L. Kurunczi and Z. Simon 21
Modern methods for determination of protein primary structure Bidimensional electrophoresis and mass spectrometry; S. Popa 35
Identification and characterisation of biologic macromolecules Recombinat DNA techniques; O. Sârbu and C. A. Ţaţu. 45
Receptor-ligand interaction from the point of view of molecular biology; C.A.Ţaţu şi T. I. Oprea 59
Specificity in receptor-effector interaction; Z. Simon 76
Gene regulation in eukaryotes; Z. Simon 86
Cell growth and division; Z. Simon 98
Mathematical modelling; G. I. Mihalaş and Z. Simon 107
Apoptosis. A molecular point of view; C. A. Ţaţu 113
Aplications of molecular biology. Gene therapy; C. A. Ţaţu and O. Sârbu 123
Self-nonself discrimination in immune defence; Z. Simon and F. Schneider 133
Molecular basis of the regulatory role of the immune system; F. Schneider 147

English abstract 153

Scanned with OKEN Scanner

Cartea porneşte de la chimia, fizica şi matematica biologicului, tratează problemele funcţionale de bază ale treptei sistemice celulare şi se încheie cu aspecte ale imunologiei umorale şi celulare, precum şi ale participării sistemului imun în reglajul supracelular al ansamblului organismic.

Probitatea ştiinţifică este garantată de coordonatorii reprezentaţi de profesorul Zeno Simon – eminent specialist în biologie teoretică, binecunoscut în lumea ştiinţifică mondială, şi de profesorul Francisc Schneider unul dintre cei mai reprezentativi fiziologi români, cu recunoaştere europeană.

ISBN 973-9320-07-4

Scanned with OKEN Scanner